

**Identifizierung und Charakterisierung
von regulativen Interaktionspartnern der
Glucokinase
in der β -Zelle des Pankreas und der Leber**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Simone Erika Baltrusch

aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. U. Panten

2. Referent: Prof. Dr. S. Lenzen

eingereicht am: 10.08.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 11.10.2000

2001
(Druckjahr)

Für meine Eltern

Die vorliegende Dissertation wurde im Oktober 1997 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. S. Lenzen am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover begonnen und im Juli 2000 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. S. Lenzen

danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, seine hilfreiche Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. S. Lenzen für das mir entgegengebrachte Vertrauen während der Durchführung der Dissertation und sein außerordentliches persönliches Engagement.

Herrn Prof. Dr. U. Panten

von der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung der Dissertation an der Fakultät für Pharmazie sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Dr. M. Tiedge

danke ich für seine Hilfe bei den vielen Fragen zur Konzeption und Durchführung der Versuche sowie die sehr gute Betreuung. Seine stetige Diskussionsbereitschaft hat einen großen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. Matthias Elsner, Dr. Stephan Lortz und PD Dr. Ingo Rustenbeck sowie Maren Böger, Anke Hager, Dagmar Lischke, Britta Lueken und Martin Wirth. Insbesondere möchte ich mich bei Matthias und Stephan für die vielen guten Gespräche sowie bei Anke und Britta für ihre Geduld beim gemeinsamen Aufbau der Hefezellkultur bedanken.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Baltrusch, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. Charakterisierung von Glucokinase-bindenden Proteinen mit Hilfe einer Phage Display Peptide Library. *Diabetes und Stoffwechsel* **8**: Suppl 1, 6 (1999).

Baltrusch, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. Characterisation of Glucokinase interacting proteins through a phage display peptide library. *Diabetologia* **42**: Suppl 1, 454 (1999).

Baltrusch, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. Identifizierung von Glucokinase Interaktionspartnern unter Verwendung der Two-Hybrid Methode. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **108**: Suppl 1/00, S76 (2000).

Baltrusch, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. Yeast Two-Hybrid system analysis of glucokinase protein interactions. *Diabetologia* **43**: Suppl 1, 176 (2000).

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | <i>Glucosehomöostase und Diabetes mellitus</i> | <i>1</i> |
| 1.2 | <i>Glucoseinduzierte Insulinsekretion in β-Zellen des Pankreas</i> | <i>1</i> |
| 1.3 | <i>Hexokinasen und Glucokinase</i> | <i>4</i> |
| 1.4 | <i>Glucokinasegenstruktur.....</i> | <i>5</i> |
| 1.5 | <i>Glucokinaseproteinstruktur.....</i> | <i>5</i> |
| 1.6 | <i>Regulation der Glucokinaseenzymaktivität.....</i> | <i>7</i> |
| 1.7 | <i>Das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber</i> | <i>8</i> |
| 1.8 | <i>Bindungsverhalten zwischen der Glucokinase und dem Glucokinase-Regulatorprotein.....</i> | <i>10</i> |
| 1.9 | <i>Intrazelluläre Bindung und Translokation der Glucokinase.....</i> | <i>12</i> |
| 1.10 | <i>Identifizierung von Proteinbindungsmotiven: Das Phage Display System.....</i> | <i>15</i> |
| 1.11 | <i>Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen: Das Two Hybrid System.....</i> | <i>17</i> |
| 1.12 | <i>Fragestellung.....</i> | <i>21</i> |
| 2 | Materialien und Methoden..... | 22 |
| 2.1 | <i>Materialien</i> | <i>22</i> |
| 2.2 | <i>Allgemeine Molekularbiologische Methoden</i> | <i>28</i> |
| 2.2.1 | <i>Ausgangsvektoren mit den cDNA-Sequenzen der humanen β-Zell und Leber Glucokinase, des Glucokinase-Regulatorproteins der Rattenleber und der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase</i> | <i>28</i> |
| 2.2.2 | <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> | <i>28</i> |
| 2.2.3 | <i>Restriktionsverdau von DNA</i> | <i>29</i> |
| 2.2.4 | <i>Dephosphorylierung der kohäsiven Enden von Plasmiden</i> | <i>29</i> |
| 2.2.5 | <i>Aufreinigung von DNA</i> | <i>30</i> |
| 2.2.6 | <i>Ligation.....</i> | <i>30</i> |
| 2.2.7 | <i>Herstellung elektrokompenter Bakterien.....</i> | <i>30</i> |
| 2.2.8 | <i>Elektrotransformation.....</i> | <i>31</i> |
| 2.2.9 | <i>Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-, Maxiprep).....</i> | <i>32</i> |
| 2.2.10 | <i>Agarosegelelektrophorese</i> | <i>33</i> |
| 2.2.11 | <i>Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i> | <i>33</i> |
| 2.2.12 | <i>Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA</i> | <i>33</i> |
| 2.2.13 | <i>DNA Sequenzierung.....</i> | <i>34</i> |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 2.3 | <i>Allgemeine proteinchemische Methoden</i> | 34 |
| 2.3.1 | SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)..... | 34 |
| 2.3.2 | <i>Western Blot</i> -Transfer | 36 |
| 2.3.3 | <i>Western Blot</i> -Hybridisierung..... | 37 |
| 2.3.4 | Proteinbestimmung mit der <i>Bradford</i> -Methode | 38 |
| 2.4 | <i>Methoden zur Koimmunopräzipitation</i> | 38 |
| 2.4.1 | RINm5F-GK Zellen..... | 38 |
| 2.4.2 | Kultivierung der RINm5F-GK Zellen | 38 |
| 2.4.3 | Zellpassagierung..... | 39 |
| 2.4.4 | Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer..... | 39 |
| 2.4.5 | Einbau von [³⁵ S] L-Methionin in RINm5F-GK Zellen | 40 |
| 2.4.6 | Immunopräzipitation der Glucokinase aus einem Lysat von RINm5F-GK Zellen unter Verwendung von Protein A-Agarose | 41 |
| 2.5 | <i>Methoden des „Phage Display“ Systems</i> | 42 |
| 2.5.1 | Ph.-D.-12 TM Phage Display Peptide Library von New England Biolabs | 42 |
| 2.5.2 | Immobilisierung von His ₆ -Tag humaner β -Zell Glucokinase an Ni-NTA- <i>HisSorb</i> -Strips der Firma Qiagen | 42 |
| 2.5.3 | Immobilisierung von GST-tag Rattenleber Glucokinase-Regulatorprotein an <i>Reacti-Bind Glutathione Coated Strips</i> der Firma Pierce | 43 |
| 2.5.4 | Isolierung bindender Phagen durch <i>Panning</i> | 43 |
| 2.5.5 | Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters | 45 |
| 2.5.6 | Amplifikation der eluierten Phagen des Panningeluats..... | 46 |
| 2.5.7 | Isolierung der amplifizierten Phagen durch PEG/NaCl-Präzipitation..... | 46 |
| 2.5.8 | Amplifikation von isolierten Phagenklonen..... | 46 |
| 2.5.9 | Aufreinigung von einzelsträngiger DNA aus Phagen zur Sequenzierung | 47 |
| 2.5.10 | Amplifikation von Phagenklonen für Bindungsexperimente | 47 |
| 2.5.11 | Charakterisierung der Bindungsaffinität von Phagenklonen durch ELISA | 47 |
| 2.6 | <i>Vektorgestützte sequenzspezifische Mutagenese im Altered Sites II Verfahren</i> ...48 | |
| 2.6.1 | Sequenzspezifische Mutagenese des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber.48 | |
| 2.6.2 | Präparation von pAlter-1-Phagemid-Einzelstrang-DNA | 49 |
| 2.6.3 | Design der Mutations-Oligonukleotide | 50 |
| 2.6.4 | Phosphorylierung der Mutations-Oligonukleotide | 51 |
| 2.6.5 | Annealing-Reaktion und Synthese des mutierten Strangs..... | 51 |
| 2.6.6 | Transformation von <i>E. coli</i> ES1301mutS und <i>E. coli</i> JM109 Bakterien..... | 52 |
| 2.7 | <i>Expression und Charakterisierung der Enzyme</i> | 53 |
| 2.7.1 | Expression der humanen β -Zell Glucokinase in <i>E. coli</i> -M15-Bakterien und Aufreinigung über Ni-NTA Agarose..... | 53 |
| 2.7.2 | Expression des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber, der Fructose-2,6-bisphosphatase und des bifunktionellen Enzyms PFK2 in <i>E. coli</i> BL21 | 53 |
| 2.7.3 | Expression des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber und der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase in <i>S. pombe</i> | 56 |
| 2.7.4 | Aufreinigung des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber, der Fructose-2,6-bisphosphatase und des bifunktionellen Enzyms PFK2 über Glutathion Sepharose 4B | 58 |
| 2.7.5 | Gezielter Verdau der GST-Fusionsproteine durch PreScission Protease..... | 59 |
| 2.7.6 | Messung der Enzymaktivität der humanen β -Zell Glucokinase..... | 59 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.7.7 | Messung der Enzymaktivität des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber | 60 |
| 2.7.8 | Messung der Enzymaktivität der Fructose-2,6-bisphosphatase und des bifunktionellen Enzyms PFK2 | 61 |
| 2.7.9 | Magnetocapture Bindungsassay mit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads | 63 |
| 2.8 | <i>Methoden des „Two Hybrid“ Systems</i> | 64 |
| 2.8.1 | MATCHMAKER GAL4 <i>Two Hybrid</i> System 2 von Clontech..... | 64 |
| 2.8.2 | Hefestämme | 68 |
| 2.8.3 | Rat Liver MATCHMAKER cDNA Library von Clontech | 68 |
| 2.8.4 | Transformation von Hefen | 69 |
| 2.8.5 | Amplifikation von transformierten Hefen auf Festmedien | 70 |
| 2.8.6 | Amplifikation von transformierten Hefen in Flüssigmedium | 71 |
| 2.8.7 | Qualitativer β -Galaktosidase Filtertest mit X-gal..... | 72 |
| 2.8.8 | Proteinpräparation aus Hefen | 72 |
| 2.8.9 | Quantitativer β -Galaktosidase Test mit <i>Galacto Star</i> Chemilumineszenz Assay (Tropix)..... | 73 |
| 2.8.10 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen..... | 73 |
| 3 | Resultate..... | 74 |
| 3.1 | <i>Untersuchungen zu Glucokinase bindenden Proteinen.....</i> | <i>74</i> |
| 3.2 | <i>Identifizierung von Glucokinase bindenden Peptiden mit Hilfe des „Phage Display“ Systems.....</i> | <i>78</i> |
| 3.2.1 | Isolierung von Glucokinase Bindungspeptiden durch Panning..... | 78 |
| 3.2.2 | Charakterisierung der Glucokinase Bindungspeptide | 87 |
| 3.3 | <i>Expression der Glucokinase bindenden Proteine in E. coli und S. pombe: Das Glucokinase-Regulatorprotein und die 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6- bisphosphatase</i> | <i>93</i> |
| 3.3.1 | Expression der Proteine in E. coli | 93 |
| 3.3.2 | Expression der rekombinanten PFK2 und des GRP in S. pombe | 98 |
| 3.3.3 | Expression des rekombinanten GRP mit dem Vektor pESP-PS-GRP | 101 |
| 3.4 | <i>Charakterisierung der PFK2- und der GRP-Bindung an die Glucokinase im Magnetocapture Assay</i> | <i>104</i> |
| 3.5 | <i>Charakterisierung der PFK2- und der GRP-Bindung an die Glucokinase im Two Hybrid System.....</i> | <i>105</i> |
| 3.6 | <i>Charakterisierung der für die Glucokinasebindung entscheidenden Aminosäuren im GRP-Protein.....</i> | <i>115</i> |
| 3.6.1 | Sequenzspezifische Mutagenese von sechs Aminosäuren des GRP-Proteins.... | 115 |
| 3.6.2 | Charakterisierung der GRP-Mutanten durch Bindung an die Glucokinase im <i>Two Hybrid</i> System | 122 |
| 3.7 | <i>Identifizierung von Glucokinase bindenden Proteinen der Leber mit Hilfe des Two Hybrid Library Screening.....</i> | <i>127</i> |
| 3.7.1 | Isolierung von Glucokinase bindenden Proteinen aus einer Rat Liver MATCHMAKER cDNA Library | 127 |
| 3.7.2 | Charakterisierung der positiven Klone des <i>Libraryscreenings</i> | 130 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.8 | <i>Identifizierung von Glucokinase-Regulatorprotein bindenden Peptiden mit Hilfe des "Phage Display" Systems</i> | 131 |
| 3.8.1 | Isolierung von Glucokinase-Regulatorprotein Bindungspeptiden durch Panning | 131 |
| 3.8.2 | Charakterisierung der Glucokinase-Regulatorprotein Bindungspeptide | 137 |
| 4 | Diskussion | 140 |
| 4.1 | <i>Glucokinase-bindende Proteine als Regulationsprinzip der Glucosephosphorylierung in den β-Zellen des Pankreas und der Leber</i> | 140 |
| 4.2 | <i>Glucokinase-Bindungspeptide</i> | 142 |
| 4.2.1 | Konsensusmotive des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber und der Phosphofructokinase Typ 2 binden an die Glucokinase..... | 142 |
| 4.2.2 | Das Sequenzmotiv A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L stellt ein bislang unbekanntes neues Bindungssepitop der Glucokinase dar | 143 |
| 4.3 | <i>Interaktion zwischen der Glucokinase und dem bifunktionellen Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase</i> | 144 |
| 4.4 | <i>Interaktion zwischen der Glucokinase und dem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber</i> | 148 |
| 4.4.1 | Das Konsensusmotiv ¹⁸⁸ L-S-A-X-X-V-A-G ¹⁹⁵ bestimmt die Interaktion des Glucokinase-Regulatorproteins mit der Glucokinase..... | 149 |
| 4.4.2 | Aliphatische und neutrale Aminosäuren vermitteln die Bindung des Glucokinase-Regulatorproteins an die Glucokinase | 150 |
| 4.4.3 | Ein in das nukleäre Exportsignal integrierte Asparagin-Leucinmotiv der Glucokinase vermittelt die Interaktion mit dem Glucokinase-Regulatorprotein..... | 151 |
| 4.4.4 | Das Glucokinase-Regulatorprotein ist im <i>Two Hybrid</i> Screening der entscheidende Modulator für Translokationsprozesse der Glucokinase in der Leber | 153 |
| 5 | Zusammenfassung | 155 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 159 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| <i>cpm</i> | <i>counts per minute</i> |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| dd H ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| F26P ₂ ase | Fructose-2,6-bisphosphatase |
| g | Erdbeschleunigung |
| GK | Glucokinase |
| GRP | Glucokinase-Regulatorprotein |
| GST | Glutathion-S-transferase |
| h | Stunde |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| Ki | 6-Phosphofructo-2-kinase |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| M | molar |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| ms | Millisekunden |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|---|
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| N | Normal |
| nm | Nanometer |
| ng | Nanogramm |
| OD | optische Dichte |
| PFK2 | 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase |
| pH | negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) |
| SEM | Standardfehler der Mittelwerte (<i>Standard Error of Means</i>) |
| Tab. | Tabelle |
| U | Unit |
| UV | ultraviolett |
| v/v | Volumenanteile bezogen auf das Gesamtvolumen |
| z.B. | zum Beispiel |
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| μF | Mikrofarad |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | mikromolar |

Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

| | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|------------|
| A (Ala) | Alanin | G (Gly) | Glycin | P (Pro) | Prolin |
| R (Arg) | Arginin | H (His) | Histidin | S (Ser) | Serin |
| N (Asn) | Asparagin | I (Ile) | Isoleucin | T (Thr) | Threonin |
| D (Asp) | Asparaginsäure | K (Lys) | Lysin | W (Trp) | Tryptophan |
| C (Cys) | Cystein | L (Leu) | Leucin | Y (Tyr) | Tyrosin |
| E (Glu) | Glutaminsäure | M (Met) | Methionin | V (Val) | Valin |
| Q (Gln) | Glutamin | F (Phe) | Phenylalanin | | |

1 Einleitung

1.1 *Glucosehomöostase und Diabetes mellitus*

Die Regulation der Blutglucosekonzentration im Organismus erfolgt in einem engen Bereich von 80 - 120 mg/dl. Die entscheidenden Variablen für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase sind Resorption, Metabolismus und Neusynthese von Substraten wie Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren. Die katabolen biochemischen Prozesse werden dabei in den Organen Leber, Muskulatur und Fettgewebe durch die Hormone Glucagon, Cortisol und Adrenalin verstärkt. Dagegen werden anabole Stoffwechselprozesse wie die Glykogensynthese, die Umwandlung von Glucose in Triglyceride und die Glucoseutilisation durch Insulin vermittelt. Insulin ist ein in den β -Zellen des Pankreas gebildetes Peptidhormon. Ein Mangel an Insulin führt zu einer gestörten Glucosehomöostase, deren klinisch manifestierten Formen als Diabetes mellitus bezeichnet werden. Die kumulative Prävalenz des Diabetes mellitus beträgt in den westlichen Industriestaaten 3 – 4 %, wovon etwa 10 – 20 % dem Typ 1 und 80 – 90 % dem Typ 2 zuzuordnen sind. Beim Typ 1 Diabetes liegt ein absoluter Insulinmangel vor, der durch eine multifaktorielle Zerstörung der β -Zellen im Rahmen eines Autoimmunprozesses hervorgerufen wird. Dagegen ist der Typ 2 Diabetes mellitus primär durch eine Insulinresistenz der Zielorgane sowie eine Sekretionsstörung der β -Zellen charakterisiert.

1.2 *Glucoseinduzierte Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas*

Zur Aufrechterhaltung der Blutglucosehomöostase ist eine ungestörte Stimulus-Sekretionskopplung in den β -Zellen des Pankreas notwendig. Das Signal für die glucoseinduzierte Insulinsekretion entsteht im Stoffwechsel der β -Zelle (Lenzen 1990; Lenzen 1992; Lenzen & Panten 1988; Meglasson & Matschinsky 1986). Zwei Strukturen der β -Zelle spielen dabei eine besondere Rolle, da sie in der Lage sind, extrazelluläre millimolare Glucosekonzentrationen an entsprechende glykolytische Fluxänderungen zu koppeln. Das ist zum einen der niedrigaffine Glucosetransporter GLUT2 (Bell *et al.* 1990;

Kayano *et al.* 1990; Lenzen & Tiedge 1994; Thorens 1992; Unger 1991) und zum anderen das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase (Iynedjian 1993; Lenzen 1992; Lenzen & Panten 1988; Matschinsky *et al.* 1993a; Meglasson & Matschinsky 1984; Meglasson & Matschinsky 1986). Für beide Strukturen liegen die K_m -Werte für Glucose im millimolaren Konzentrationsbereich und stellen somit das ideale Kopplungsglied an den Stoffwechsel der pankreatischen β -Zelle dar.

Der in Abbildung 1.1 dargestellte Mechanismus der Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion stellt ein Konsensmodell nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung dar (Efrat *et al.* 1994; Lenzen 1992).

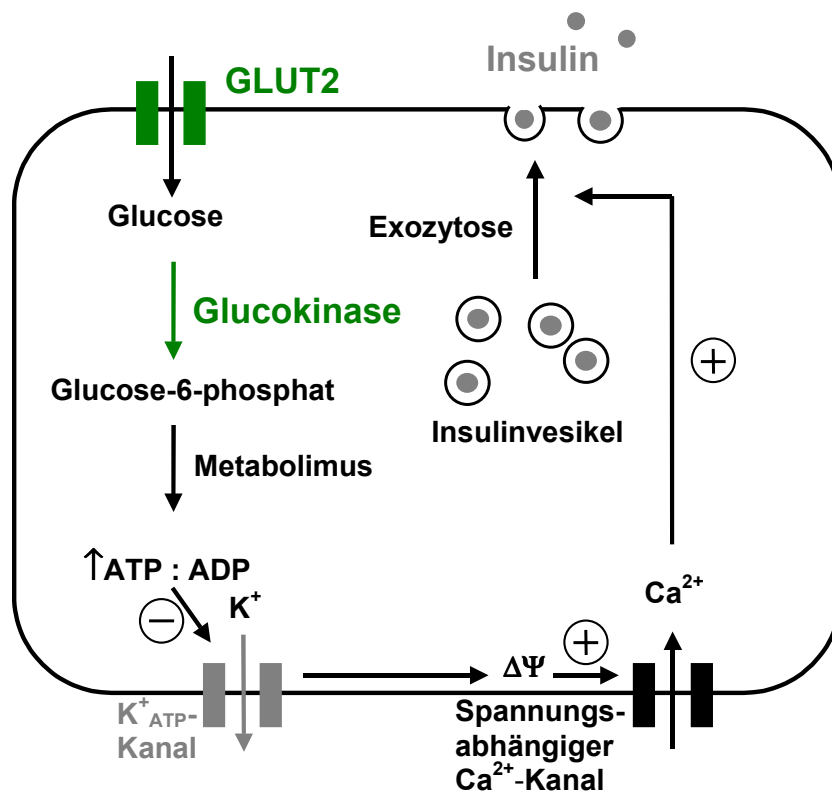


Abb. 1.1: Modell des Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas

Glucose, die extrazellulär in millimolaren Konzentrationen vorliegt, gelangt gemäß des Konzentrationsgradienten durch den Glucosetransporter GLUT2 mittels erleichterter

Diffusion in die Zelle. Dort wird die Glucose im ersten Schritt der Glykolyse durch das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase (Hexokinase Typ IV) phosphoryliert. Wie kinetische Studien zeigen konnten, ist dabei die Glucosephosphorylierung und nicht der Glucosetransport in die β -Zelle des Pankreas der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Glucosemetabolismus. Infolge der Generierung von ATP und NADH im Intermediärstoffwechsel der Glucose wird der ATP/ADP-Quotient der β -Zelle des Pankreas erhöht. Der ATP-sensitive Kaliumkanal, der sich aus dem Kanalprotein KIR 6.2 und dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR 1 zusammensetzt, wird daraufhin geschlossen und bewirkt eine Depolarisation der Plasmamembran (Aguilar-Bryan *et al.* 1998; Panten *et al.* 1992; Panten *et al.* 1996; Panten *et al.* 1988; Raab-Graham *et al.* 1999). Die folgende Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen triggert den Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum, der dann zur Exozytose der Insulingranula führt.

Untersuchungen an Patienten mit einer erblichen Form des nicht-insulinpflichtigen MODY Diabetes mellitus (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), an diabetischen Tiermodellen und an transgenen *knockout*-Tieren konnten eindrucksvoll die Bedeutung des Glucosetransports und der Glucosephosphorylierung für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion belegen (Bali *et al.* 1995; Froguel & Velho 1994; Froguel *et al.* 1993a; Froguel *et al.* 1993b; Grupe *et al.* 1995; Hattersley & Turner 1993; Hattersley *et al.* 1992; Oka 1994; Patel *et al.* 1992; Permutt 1991; Permutt *et al.* 1992). Alle bislang vorliegenden Studien stützen den Schluß, daß für einen einwandfreien Glucoseerkennungsapparat in der β -Zelle des Pankreas sowohl die Expression eines Glucosetransporters mit ausreichender Transportkapazität als auch der Glucokinase notwendig ist, obwohl kinetische Untersuchungen belegen, daß die Glucosetransportkapazität in der normalen β -Zelle des Pankreas um den Faktor 50 – 100 größer ist als die Glucosephosphorylierungskapazität der Glucokinase (Heimberg *et al.* 1993; Tal *et al.* 1992). Hypothesen, die eine Interaktion zwischen dem Glucosetransporter GLUT2 und der Glucokinase postulieren, haben bislang keine stichhaltigen Resultate erbracht (Hughes *et al.* 1993). In Hefe *Two Hybrid* Untersuchungen konnte keine Bindung der Glucokinase an die zytoplasmatischen Abschnitte des aus zwölf transmembranären Domänen bestehenden GLUT2-Proteins nachgewiesen werden (eigene Untersuchungen).

Im Folgenden wird die Glucokinase als Signalerkennungsenzym für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion genauer beschrieben.

1.3 Hexokinasen und Glucokinase

In eukaryoten Zellen ist der erste Schritt des Glucosemetabolismus der Transfer einer Phosphatgruppe des ATP auf die 6-Hydroxylgruppe des Glucosemoleküls. Diese Reaktion wird durch eine Gruppe von strukturell verwandten Hexose-Phosphotransferasen katalysiert. Diese zeigen neben unterschiedlichen Molekulargewichten auch unterschiedliche kinetische Eigenschaften sowie gewebespezifische Expressionen. Sie können daher in zwei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören die Hexokinase-Isoenzyme I – III, die ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und eine hohe Affinität für das Substrat Glucose mit K_m -Werten im Bereich von 20 - 130 μ M haben. Sie zeichnen sich durch eine Produkthemmung durch physiologische Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat aus (Middleton 1990).

Die zweite Gruppe ist durch die Hexokinase Typ IV oder Glucokinase (EC 2.7.1.2) repräsentiert, welche ein deutlich geringeres Molekulargewicht von ca. 52 kDa und eine wesentlich geringere Affinität zum Substrat Glucose mit einem K_m -Wert von ca. 10 mM besitzt (Iynedjian 1993; Lenzen 1990; Lenzen 1992; Matschinsky 1990; Printz *et al.* 1993b). Untersuchungen an der Glucokinase der Ratte zeigten, daß α -Anomere der Hexosen gegenüber β -Anomeren bevorzugt umgesetzt werden (Lenzen *et al.* 1987). Der Name Glucokinase ist historisch auf die Selektivität für das Substrat Glucose zurückzuführen. Er trifft die kinetischen Eigenschaften des Enzyms nicht exakt, da die Hexosen D-Mannose (80 %), D-Fructose (20 %) und D-2-Deoxyglucose (40 % des V_{max} -Wertes von D-Glucose der Rattenleber-Glucokinase) ebenfalls von der Glucokinase phosphoryliert werden, wenn auch mit deutlich geringerer Affinität (Printz *et al.* 1993b; Tiedge *et al.* 1997). Die Glucokinase zeigt eine kooperative Reaktionskinetik für das Substrat Glucose mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{Hill} = 1,5 - 1,7$ und einem entsprechenden sigmoidalen Reaktionsverlauf (Lenzen 1992; Printz *et al.* 1993b; Tiedge *et al.* 1997). Der Umkehrpunkt der sigmoidalen Aktivitätskurve liegt im Bereich von 5 mM Glucose und damit nahe an der Schwelle der β -Zelle des Pankreas für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Die positive Kooperativität führt dazu, daß im Fastenzustand geringe Anstiege des Blutglucosespiegels über 5 mM eine drastischere

Zunahme der Glucosephosphorylierung bewirken, als dies bei einer regulären Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten wäre (Matschinsky *et al.* 1993b). Im Unterschied zu den Hexokinasen Typ I – III wird die Glucokinase nicht durch physiologische Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat gehemmt (Lenzen 1992).

In den β -Zellen des Pankreas und der Leber ist die Expression der Glucokinase von entscheidender Bedeutung. Mit den charakterisierten Eigenschaften ist sie in der β -Zelle das ideale Signalerkennungsenzym für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion und in der Leber ein wesentlicher Regulator des Glucosestoffwechsels. Ferner gibt es Hinweise darauf, daß die Glucokinase in einigen endokrinen Zellen des Darms und des Gehirns exprimiert wird (Jetton *et al.* 1994).

1.4 Glucokinasegenstruktur

Die Glucokinase-mRNA in der Leber und der β -Zelle des Pankreas wird von einem Glucokinasegen transkribiert, das aus zehn Exons und zwei gewebespezifischen Kontrollregionen besteht. Exon 2 – 10 werden in der Leber und der β -Zelle des Pankreas gleichermaßen transkribiert und sind somit identisch. Die gewebespezifischen Kontrollregionen beinhalten neben den Promotoren auch das erste Exon und sind mehr als 27 kb voneinander getrennt (Magnuson 1990; Magnuson *et al.* 1989; Magnuson & Shelton 1989). Die Transkriptionsinitiierung erfolgt beim Leber-Promotor an einem TATA-Box-Motiv 127 kb vom Translationsstartcodon entfernt (Magnuson *et al.* 1989). Der eng begrenzte Transkriptionsbeginn über einen Bereich von sechs Basen deutet auf eine transkriptionelle Regulation des Gens hin. Der β -Zell-Promotor ist im Glucokinasegen aufwärts vom Leber-Promotor lokalisiert. Die Transkriptionsinitiierung erfolgt hier ca. 400 kb aufwärts vom Translationsstartcodon mit multiplen Startpunkten über einen Bereich von 62 Basen (Magnuson & Shelton 1989).

1.5 Glucokinaseproteinstruktur

Durch Hybridisierung entsprechender menschlicher cDNA-Bibliotheken mit einer Rattenleber-cDNA-Probe konnte die Sequenz der menschlichen Leber-Glucokinase-cDNA aufgeklärt werden und wenig später auch die Sequenz der menschlichen β -Zell-Glucokinase-cDNA (Koranyi *et al.* 1992; Nishi *et al.* 1992; Sakura *et al.* 1992; Tanizawa *et al.* 1991; Tanizawa *et al.* 1992). Die Glucokinase der Leber besteht aus 465 Aminosäuren

mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 52 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 4,85 (Andreone *et al.* 1989). Der Vergleich mit der Glucokinase-cDNA der β -Zelle zeigte, daß der kodierende Bereich ebenfalls 465 Aminosäuren umfaßt, jedoch am N-terminalen Molekülende in elf der ersten 15 Aminosäuren different ist (Magnuson & Shelton 1989).

Die schwache Expression des Enzyms im Zytoplasma erschwerte die Aufreinigung und kinetische Untersuchung insbesondere der menschlichen Isoformen. So besitzt die Glucokinase nur einen Anteil von 0,005 % am Gesamtprotein der Leber und ist in den β -Zellen nochmals um den Faktor 20 schwächer exprimiert (Andreone *et al.* 1989; Iynedjian *et al.* 1986; Iynedjian *et al.* 1987; Magnuson & Shelton 1989). *Western Blot*-Analysen des Zytosols aus β -Zellen des Pankreas und der Leber der Ratte mit einem Anti-Rattenleber-GK-Antikörper ergaben eine singuläre Bande von ca. 56 kDa (Iynedjian *et al.* 1986). Die Glucokinase der β -Zelle des Pankreas und der Leber zeigten in den Immunoblots keine signifikanten Unterschiede im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt (Iynedjian *et al.* 1986). Zwar ist es mittlerweile gelungen, die Glucokinase rekombinant in *E. coli* zu exprimieren und funktionelle Studien durchzuführen (Gidh-Jain *et al.* 1993; Pilkis *et al.* 1994; Takeda *et al.* 1993; Tiedge *et al.* 1997), einen Glucokinase-Kristall zu züchten, der für eine Röntgenstrukturanalyse tauglich ist, ist allerdings bis heute nicht möglich gewesen.

Die Glucokinase zeigt in der Aminosäuresequenz Homologien zu den anderen Hexokinasen. Die Aminosäuresequenz der Glucokinase ist zu 53 % identisch zum C-terminalen Molekülteil der Ratten-Hexokinase Typ I, zu 55 % identisch zum C-terminalen Molekülteil der Ratten-Hexokinase Typ II und zu 33 % identisch mit der Hefe-Hexokinase (Printz *et al.* 1993a). Da die Kristallstruktur der Hefe-Hexokinasen A und B bekannt ist, und sie ebenso wie die Glucokinase mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa als Monomer vorliegen, wurde auf dieser Basis ein molekulares Modell der menschlichen Glucokinase erstellt (Gidh-Jain *et al.* 1993; Pilkis *et al.* 1994; St. Charles *et al.* 1994; Takeda *et al.* 1993; Xu *et al.* 1995a; Xu *et al.* 1995b; Xu *et al.* 1994). Die Hefe-Hexokinase gliedert sich in zwei Domänen, die durch einen Spalt getrennt werden, in dem das aktive Zentrum lokalisiert ist (Anderson *et al.* 1978). Die Sequenzmotive des aktiven Zentrums sowie die Oberflächen des Spalts sind hoch konserviert und erlauben so durch den Austausch von Aminosäuren, ein Modell der Glucokinase zu erstellen, obwohl die

Gesamtamino säuresequenzen der beiden Proteine nur zu 33 % übereinstimmen. Nach diesem Modell wird die Glucosebindungsstelle durch die Aminosäuren Lys-56, Asn-204, Asp-205, Gly-229, Asn-231, Glu-256, Gln-287 und Glu-290 im Glucokinaseprotein gebildet (Xu *et al.* 1995a; Xu *et al.* 1994). Sie treten mit den Hydroxylgruppen des Substrats Glucose in Wechselwirkung und bedingen damit die für die Katalyse notwendige Konformationsänderung, bei der sich der Winkel zwischen den beiden Domänen verringert. Die Mutation von Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, führte dementsprechend zu einem signifikanten Anstieg des K_m -Wertes, da die Bindung für das Substrat Glucose geschwächt wird, und zu einer Abnahme des V_{max} -Wertes, da die Glucose-Phosphorylierungsreaktion eng mit einer substratinduzierten Konformationsänderung des Glucokinaseproteins verknüpft ist. Das kooperative Verhalten des Enzyms scheint somit eng mit der Substratbindung von Glucose assoziiert zu sein (Xu *et al.* 1995b).

1.6 Regulation der Glucokinaseenzymaktivität

Untersuchungen der Glucokinaseenzymaktivitäten zeigen in der β -Zelle des Pankreas und in der Leber eine deutliche gewebespezifische Regulation. In der Leber wird die Enzymaktivität im Wesentlichen durch die Hormone Insulin und Glucagon kontrolliert (Iynedjian *et al.* 1988; Iynedjian *et al.* 1989; Iynedjian *et al.* 1987; Nospikel *et al.* 1992; Nospikel & Iynedjian 1992). Die Transkriptionsrate des Glucokinasegens wird durch Insulin stimuliert und durch Glucagon gehemmt. Nach exogener Gabe von Insulin kommt es zu einer Induktion der Glucokinasegentranskription innerhalb von 1 – 4 h (Iynedjian *et al.* 1989). Nach einer Fastenperiode von 48 h ist die Transkriptionsrate in der Leber um mehr als 97 % reduziert (Tiedge & Lenzen 1995). Die Glucokinasegenexpression der Leber wird nicht von der Glucosekonzentration beeinflusst (Matsuda *et al.* 1990). Im Unterschied hierzu ist Glucose in den β -Zellen des Pankreas ein Stimulator der Glucokinasegenexpression. Untersuchungen an isolierten und kultivierten Pankreasinseln der Ratte konnten klar belegen, daß Glucose und nicht Insulin einen Anstieg der Enzymaktivitäten bewirkt (Liang *et al.* 1994; Liang *et al.* 1992; Tiedge & Lenzen 1995). Die Induktion der Glucokinaseenzymaktivitäten durch Glucose in der β -Zelle des Pankreas verläuft zweiphasig (Chen *et al.* 1994). In den initialen 6 h nach der Inkubation der Pankreasinseln bei hohen Glucosekonzentrationen erhöht sich nur der V_{max} -Wert der Glucokinase um 50 %, nicht aber die durch *Western Blot*-Analyse bestimmte Menge an

Glucokinaseprotein in der Zelle. Im weiteren Verlauf steigt dann auch die Menge an Glucokinaseprotein um 40 % an. Damit ist die Glucokinaserregulation über den Ernährungsstatus in β -Zellen des Pankreas deutlich schwächer ausgeprägt als in der Leber (Tiedge & Lenzen 1991).

Inhibitoren der Glucokinase sind die Zucker D-Glucosamin, N-Acetyl-Glucosamin und Mannoheptulose, die aufgrund ihrer Struktur nicht phosphoryliert werden können, jedoch die Glucosebindungsstelle der Glucokinase kompetitiv besetzen (Lenzen 1992). Ferner hemmen Alloxan und Ninhydrin die Glucokinase der β -Zelle des Pankreas sowie der Leber durch Interaktion mit SH-Gruppen. Die metabolisierbaren Hexosen Glucose und Mannose sowie der kompetitive Inhibitor Mannoheptulose können vor dieser Hemmung schützen (Lenzen *et al.* 1988a; Lenzen *et al.* 1987). SH-Gruppen protektive Substanzen wie Dithiothreitol und Glutathion schützen die Glucokinase ebenfalls vor der Hemmung durch Alloxan und Ninhydrin und machen sogar eine bereits erfolgte Hemmung unter Wiederherstellung der Enzymaktivität reversibel (Lenzen *et al.* 1988a; Lenzen *et al.* 1988b; Lenzen *et al.* 1990; Lenzen *et al.* 1987). Dies legt eine Beteiligung von Cysteinresiduen, wie sie in der Glucokinase hochkonserviert vorliegen, am Hemmprozeß nahe (Lenzen 1992; Tiedge *et al.* 1997; Tiedge & Lenzen 1995).

Weiterhin vermögen auch langkettige, Coenzym A-veresterte Fettsäuren wie das Palmitoyl-CoA, die Glucokinaseenzymaktivitäten reversibel zu hemmen. Das Ausmaß der Hemmung ist dabei abhängig von der Länge der Kohlenwasserstoffkette und der Konzentration an zweiwertigen Kationen, insbesondere Mg^{2+} . Die physiologische Relevanz dieser Hemmung ist aufgrund der notwendigen Konzentrationen jedoch fraglich (Lin *et al.* 1989; Printz *et al.* 1993b; Tippet & Neet 1982a; Tippet & Neet 1982b).

1.7 Das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber

Neben den bereits genannten Mechanismen spielt die Interaktion der Glucokinase mit dem Glucokinase-Regulatorprotein eine entscheidende Rolle in der posttranslationalen Enzymregulation der Leber. Durch van Schaftingen und Mitarbeiter wurde dieses Regulatorprotein zuerst in der Rattenleber identifiziert (Van Schaftingen 1989). Die Untersuchungen stützten sich auf die Beobachtung, daß Fructose die

Glucosephosphorylierung in Hepatozyten stimuliert und dieser Effekt durch Fructose-1-phosphat vermittelt wird (Clark *et al.* 1979; Van Schaftingen & Vandercammen 1989).

Das als kompetitiver Inhibitor der Glucokinase fungierende Glucokinase-Regulatorprotein besteht aus 626 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 68,5 kDa (Detheux *et al.* 1993). Das humane Leberprotein ist dem Rattenprotein zu 88 % homolog (Warner *et al.* 1995). Der Effekt der Inhibierung der Glucokinase durch das Glucokinase-Regulatorprotein wird durch Fructose-6-phosphat gefördert und durch Fructose-1-phosphat antagonisiert (Van Schaftingen 1989; Vandercammen & Van Schaftingen 1990; Vandercammen & Van Schaftingen 1991). Die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes aus Glucokinase und Glucokinase-Regulatorprotein wird dabei durch die Bindung der beiden Phosphatester moduliert (Vandercammen *et al.* 1992). Die Fructose-6-phosphatkonzentration in der Leber ist unter den Bedingungen der Glykogenolyse und/oder der Gluconeogenese erhöht. Dies führt über die verstärkte Bindung der Glucokinase durch das Glucokinase-Regulatorprotein zu einer Abnahme der Glucosephosphorylierung und damit zu einem Anstieg der Nettoglucoseproduktion der Leber (Van Schaftingen 1995). Aus Fructose gebildetes Fructose-1-phosphat stimuliert dagegen die Glucosephosphorylierung und damit die Glucoseutilisation. Somit stellt die Fructose bei kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme ein Nährstoffsignal der Glucoseutilisation in der Leber dar, an deren Übermittlung das Glucokinase-Regulatorprotein beteiligt ist (Van Schaftingen *et al.* 1994).

Das Glucokinase-Regulatorprotein konnte nur in der Leber von Säugetieren nachgewiesen werden, die auch die Glucokinase exprimieren (Vandercammen & Van Schaftingen 1993). Daneben ließ sich in der Leber von *Xenopus laevis* ein Protein mit einer Homologie von 57 % zum Rattenleberprotein nachweisen. Dieses wird zwar nicht durch Fructose-1-phosphat und Fructose-6-phosphat moduliert, hemmt aber die Glucokinase der Rattenleber und kann damit als Homologon des Rattenleber Glucokinase-Regulatorproteins in den niederen Wirbeltieren angesehen werden (Veiga da Cunha *et al.* 1994). Da an Pankreasinselextrakten eine Glucokinaseaktivitätszunahme in Gegenwart von Fructose-1-phosphat gezeigt werden konnte, wurde zunächst angenommen, daß das Glucokinase-Regulatorprotein auch in β -Zellen des Pankreas exprimiert wird (Malaisse *et al.* 1990). Jedoch konnte das Protein dort weder durch *Northern Blot*-Analysen und *Western Blot*-

Analysen noch in funktionellen Studien nachgewiesen werden (Becker *et al.* 1996; Tiedge *et al.* 1999).

1.8 Bindungsverhalten zwischen der Glucokinase und dem Glucokinase-Regulatorprotein

Bislang konnten die für die Bindung zwischen dem Glucokinase-Regulatorprotein und der Glucokinase verantwortlichen Aminosäuresequenzen in keinem der beiden Proteine vollständig identifiziert werden. Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens dienten das bereits beschriebene Modell der Glucokinasestruktur (St. Charles *et al.* 1994), sowie Mutationsanalysen und ein Vergleich des Bindungsverhaltens der einzelnen Isoformen des Glucokinase-Regulatorproteins sowie der Glucokinase (Veiga-da-Cunha *et al.* 1996).

Da die Rattenleber Glucokinase durch das Regulatorprotein von *Xenopus laevis* gehemmt wird und ebenso *Xenopus laevis* Glucokinase durch das Glucokinase-Regulatorprotein der Rattenleber inhibiert wird, müssen die bindenden Aminosäuren in der Evolution konserviert worden sein (Vandercammen & Van Schaftingen 1993). Die *Xenopus laevis* Glucokinase besitzt eine Homologie von 79 % zum Rattenleberprotein. Die homologen und damit konservierten Bereiche befinden sich unter Bezugnahme auf das Glucokinasestrukturmodell in der etwas kleineren Domäne und dem dazu benachbarten Winkelbereich zwischen den Domänen. Durch Mutationen in diesen Bereichen konnte einerseits gezeigt werden, daß die Bindungsstellen des katalytischen Zentrums nicht gleichzeitig auch Bindungsstellen des Glucokinase-Regulatorproteins sind. Andererseits konnte ein Einfluß der Aminosäuren His-141, Lys-142, Lys-143 und Leu-144 an der Spitze der kleineren Domäne sowie der Aminosäuren Glu-51 und Glu-52 auf der großen Domäne im Winkelbereich der Glucokinase auf das Bindungsverhalten zum Glucokinase-Regulatorprotein nachgewiesen werden (Veiga da Cunha *et al.* 1996). Mutationsanalysen der humanen β -Zell Glucokinase zeigten weiterhin, daß die Aminosäuren Asn-166, Val-203, Asn-204, Ala-208 und Lys-414, die alle im oder in der Nähe des Winkelbereichs liegen, die Komplexbildung zwischen Glucokinase und Glucokinase-Regulatorprotein beeinflussen. Dabei führt eine Mutation der Aminosäuren Val-203 und Asn-204 auch zu einer Abnahme der Glucokinaseenzymaktivität (Veiga-da-Cunha *et al.* 1996).

Ferner unterscheiden sich die humane β -Zell- und Leberglucokinase sowie die Enzyme der Ratte alle in den ersten 15 Aminosäuren des N-terminalen Endes, zeigen aber die gleiche Affinität zum Glucokinase-Regulatorprotein. Daher kann dieser Bereich, der in der großen Domäne lokalisiert ist, nicht für die Bindung verantwortlich sein (Gidh-Jain *et al.* 1993; Moukil *et al.* 2000; Pilkis *et al.* 1994; Veiga-da-Cunha *et al.* 1996). Auf den genannten Ergebnissen und der Annahme, daß das Glucokinase-Regulatorprotein ebenfalls als zweischenkeliges Protein vorliegt, basiert das in Abbildung 1.2 dargestellte Modell von van Schaftingen. Die Glucokinase kann nur in der offenen Konformation, in der das katalytische Zentrum frei ist, an das Glucokinase-Regulatorprotein binden. Grau unterlegt sind die bereits beschriebenen Bereiche an der Spitze der kleineren Domäne sowie im Winkelbereich der Glucokinase, an die das Glucokinase-Regulatorprotein bindet. Ob dies wie angenommen wirklich zwei Bindungszentren oder nur Teilbereiche eines einzigen großen Bindungsbereichs sind, ist ungeklärt. Wird Fructose-6-phosphat, welches den Enzym-Inhibitor-Komplex durch Bindung stabilisiert, durch Fructose-1-phosphat verdrängt, so kommt es zu einer Konformationsänderung des Glucokinase-Regulatorproteins und zu einer Dissoziation des Komplexes.

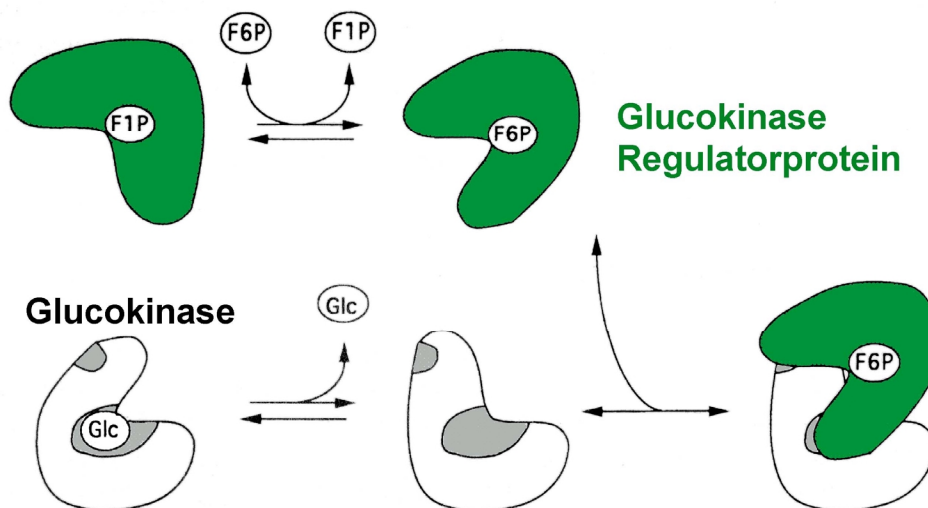


Abb. 1.2: Strukturmodell für das Bindungsverhalten zwischen Glucokinase und Glucokinase-Regulatorprotein

1.9 Intrazelluläre Bindung und Translokation der Glucokinase

Neben der Bindung an das Glucokinase-Regulatorprotein ist die Bindung der Glucokinase an Zellkompartimente von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe einer selektiven Permeabilisierungstechnik mit Digitonin gelang es Agius und Mitarbeitern, einen diffusiblen, ungebundenen Glucokinaseanteil von einem matrixgebundenen in Hepatozyten der Ratte zu unterscheiden (Agius 1994a; Agius 1994b; Agius & Peak 1993; Agius *et al.* 1995). Eine Abwesenheit von Magnesiumionen während der Permeabilisierung führt dabei zu einem hohen Anteil ungebundener Glucokinase. Eine Magnesiumionenkonzentration von 0,5 – 5 mM bewirkt, daß etwa nur 25 % der Glucokinase frei vorliegen. Da unspezifische Effekte auf die Permeabilität der Plasmamembran ausgeschlossen werden können, stellen Magnesiumionen somit einen wichtigen Kofaktor für die Bindung der Glucokinase sowohl an zelluläre Strukturen als auch an mögliche regulatorische Proteine dar (Agius 1996). Ebenso bewirken Fructose und Sorbitol einen deutlichen Anstieg der Glucokinase in der diffusiblen Fraktion. Das Stoffwechselprodukt beider Substanzen ist Fructose-1-phosphat, welches zu einer Dissoziation der Glucokinase vom Glucokinase-Regulatorprotein führt und damit den Anstieg der freien Glucokinase bedingt. Dabei ist die Wirkung von Sorbitol deutlich intensiver (Niculescu *et al.* 1997). Der gebundene Anteil der Glucokinase ist bei niedriger extrazellulärer Glucosekonzentration am höchsten und nimmt bei einer Glucosekonzentration von 30 mM auf ein Minimum ab. Mannose beeinflusst den Anteil der gebundenen Glucokinase gleichermaßen. Der Effekt beider Hexosen zeigt in Abwesenheit von Sorbitol eine sigmoidale Kinetik und in Anwesenheit von Sorbitol eine hyperbolische Funktion (Agius & Stubbs 2000). Diese Ergebnisse favorisieren ein Modell für die Translokation der Glucokinase, an der zwei verschiedene Glucosebindungsstellen im Glucokinaseprotein beteiligt sind. Ferner scheint ATP für den Translokationsprozeß der Glucokinase in Hepatozyten von Bedeutung zu sein (Agius & Peak 1997).

Einen weiteren Hinweis auf die Bindung der Glucokinase an einen bislang noch unbekannten Rezeptor liefert die Identifizierung von zwei Bindungsstellen in Hepatozyten (Agius *et al.* 1996; Becker *et al.* 1994; Becker *et al.* 1996). Die hochaffine Bindungsstelle mit einem K_d -Wert von 0,1 μ M und einer Bindungskapazität von 3 pmol/mg, die durch Sorbitol beeinflussbar ist, kann dem Glucokinase-Regulatorprotein zugeordnet werden. Desweiteren liegt eine niedrigaffine Bindungsstelle mit einem K_d -Wert von 1,5 μ M vor, die

bisher noch keinem Rezeptor zugeordnet werden konnte. Ein denkbarer Mechanismus einer Kooperation beider Bindungsstellen wäre die durch Substrate induzierte Translokation der Glucokinase vom Glucokinase-Regulatorprotein zur niedrigaffinen Bindungsstelle.

Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte an Rattenlebern während niedriger Glucosekonzentrationen eine Lokalisation der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins im Nukleus gezeigt werden. Mit zunehmender Glucosekonzentration war eine Translokation der Glucokinase ins Zytoplasma zu beobachten (Miwa *et al.* 1990; Toyoda *et al.* 1994; Toyoda *et al.* 1995a; Toyoda *et al.* 1995b). Diese Befunde ließen sich auch an isolierten Hepatozyten bestätigen. Gleichzeitig wurde in Gegenwart von niedrigen Fructosekonzentrationen ebenfalls eine Translokation der Glucokinase ins Zytoplasma nachgewiesen (Brown *et al.* 1997). Weiterführende Ergebnisse konnten durch die Konfokale Laser Mikroskopie unter Verwendung von Glucokinase- und Glucokinase-Regulatorprotein-Fusionsproteinen mit dem GFP bzw. BFP (Green/Blue Fluorescent Protein) gemacht werden. Nur in Anwesenheit des Glucokinase-Regulatorproteins kommt es bei niedrigen Glucosekonzentrationen zu einer Konzentrierung der Glucokinase im Nukleus. Dabei wurde das Phänomen nicht nur an Hepatozyten sondern auch an COS-1- und HeLa-Zellen gezeigt (de la Iglesia *et al.* 1999). Damit scheinen die in den Translokationsprozeß eingebundenen Mechanismen in Zellen ubiquitär vorhanden und nicht auf Hepatozyten beschränkt zu sein.

Eine Translokation des Glucokinase-Regulatorproteins ins Zytoplasma wurde zunächst ausgeschlossen (Fernandez-Novell *et al.* 1999), konnte aber nun nachgewiesen werden (Bosco *et al.* 2000; Mukhtar *et al.* 1999; Shiota *et al.* 1999). Auf Basis der genannten Ergebnisse entwickelten Magnuson und Mitarbeiter ein Modell der Glucokinase Translokation, welches in Abbildung 1.3 dargestellt ist. Hierbei gelangt die Glucokinase bei Abnahme der zytosolischen Glucosekonzentration in Form eines Huckepack-Mechanismus durch das Glucokinase-Regulatorprotein in den Zellkern. Für den nukleären Export der Glucokinase nach Dissoziation des Glucokinase-Glucokinase-Regulatorproteinkomplexes wird ein dem NES (Nuclear Export Signal) homologer Bereich im Glucokinaseprotein favorisiert (Shiota *et al.* 1999).

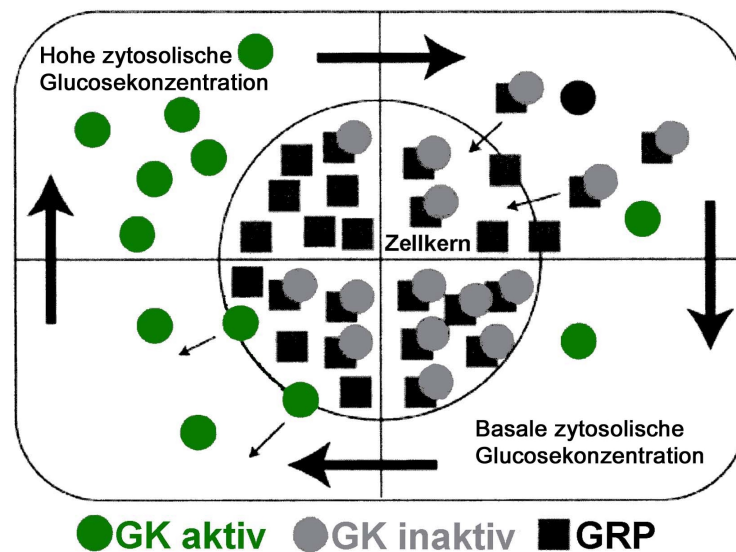


Abb. 1.3: Modell zur Glucokinase Translokation zwischen Zellkern und Zytosol und dem Einfluß des Glucokinase-Regulatorproteins auf diesen Mechanismus

Durch Glucokinase-Regulatorprotein-*knockout*-Mäuse einerseits (Farrelly *et al.* 1999; Grimsby *et al.* 2000) sowie die graduelle Überexpression des Glucokinase-Regulatorproteins andererseits (de la Iglesia *et al.* 2000) konnte klar die regulatorische und die stabilisierende Rolle des Glucokinase-Regulatorproteins gezeigt werden. Damit gliedert sich das Glucokinase-Regulatorprotein in den auf Translokationsprozessen basierenden Mechanismus der Glucokinaseregulation in der Leber ein und stellt einen wichtigen Faktor des Glucosemetabolismus dar. Es gilt nun, die für die Translokationsprozesse notwendigen Rezeptoren zu identifizieren.

In den β -Zellen des Pankreas konnte die Glucokinase nicht im Zellkern nachgewiesen werden (Jörns *et al.* 1999; Noma *et al.* 1996). Allerdings konnte ein ernährungsabhängiges Verteilungsmuster der Glucokinase in den β -Zellen durch immunhistochemische Untersuchungen gezeigt werden. Unter physiologischen Bedingungen war eine heterogene zytoplasmatische Lokalisation der Glucokinase mit einer Polarisierung zu den Gefäßen hin zu beobachten. Diese wurde im Fastenzustand durch eine homogene Verteilung abgelöst, wobei der Gehalt des Glucokinaseproteins konstant blieb (Jörns *et al.* 1999). Kompartimentierungsprozesse in der pankreatischen β -Zelle konnten damit als Regulationsprinzip der Glucokinase belegt werden. Die Expression des Glucokinase-

Regulatorproteins in INS-r3-Zellen führte zu einer Translokation der Glucokinase in den Nukleus (Bosco *et al.* 2000). Damit kann davon ausgegangen werden, daß Strukturen, die für Translokationsprozesse in der Leber verantwortlich sind, auch in der β -Zelle des Pankreas vorliegen (de la Iglesia *et al.* 1999). Durch Digitoninpermeabilisierung konnte sowohl in RINm5F-GK-Zellen, in denen die Glucokinase auf ein der Leber vergleichbares Niveau überexprimiert ist, als auch in pankreatischen Ratteninseln eine freie Glucokinasefraktion mit einer hohen Enzymaktivität von einer gebundenen Fraktion mit niedriger Aktivität unterschieden werden. Glucose führt dabei zu einem Anstieg der freien Glucokinase durch die Freisetzung des Enzymproteins von einem intrazellulären Rezeptor, der nachweislich Proteincharakter besitzt (Tiedge *et al.* 1999). Damit sind in der β -Zelle des Pankreas den Hepatozyten vergleichbare Translokations- bzw. Kompartimentierungsprozesse zur Glucokinaseregulation wahrscheinlich. Daß hier das Glucokinase-Regulatorprotein nicht exprimiert wird, kann mit der unterschiedlichen Funktion beider Zellen erklärt werden. Da die Glucokinase das Schlüsselenzym für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion in der β -Zelle des Pankreas ist, ist die Aufklärung der dort ablaufenden glucokinaseregulatorischen Faktoren von besonderer Bedeutung.

Zur Identifizierung und Charakterisierung von Glucokinase Bindungspartnern wurde in der vorliegenden Dissertation das *Phage Display* System und das *Two Hybrid* System etabliert. Diese beiden molekularbiologischen Methoden werden daher in den nächsten Kapiteln genauer erläutert.

1.10 Identifizierung von Proteinbindungsmotiven: Das Phage Display System

Mit dem Begriff *Phage Display* wird die Präsentation (*Display*) eines Peptids oder Proteins an der Oberfläche eines filamentösen Phagen (*Phage*) bezeichnet. Verwendet wird für dieses System hauptsächlich der M13 Phage, der als Ff-Phage ausschließlich *E. coli* infiziert. Das Genom dieses Bakteriophagen ist ein einzelsträngiges, zirkuläres DNA Molekül mit einer Größe von ca. 6400 Nukleotiden. Die Phagenhülle besteht aus etwa 2700 Kopien des Haupthüllproteins (*major coat protein*) pVIII und je fünf Kopien der Nebenhüllproteine (*minor coat proteins*) pIII, pVI, pVII und pIX, wobei pIII und pVI am schmalen Ende des länglichen Phagenpartikels angeordnet sind. Peptide können N-terminal mit pVIII und pIII verknüpft werden, ohne daß es zu einem Funktionsverlust des Bakteriophagen kommt (Scott & Smith 1990). Dabei sind Fusionssequenzen von acht

Aminosäuren an pVIII (Kishchenko *et al.* 1994) und bis zu 38 Aminosäuren an pIII (Kay *et al.* 1993) möglich. Durch den Einbau von degenerierten DNA Sequenzen in das Phagengenom können so Peptidbibliotheken erzeugt werden, die beispielsweise alle denkbaren Heptapeptide oder Dodekapeptide als Fusion mit pIII oder pVIII präsentieren. Smith und Mitarbeiter konnten zeigen, daß in einem solchen Fusionsprotein das Peptid für die Wechselwirkung mit einem exogenen Protein zugänglich ist (Smith 1985).

Auf dieser Grundlage entwickelten sie eine als *Panning* bezeichnete Methode, die es ermöglicht, aus einem Phagengesamtpool solche Phagen zu selektionieren, die eine spezifische Affinität zu einem vorliegenden Protein besitzen (Parmley & Smith 1988). Dieses Verfahren ist in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt.

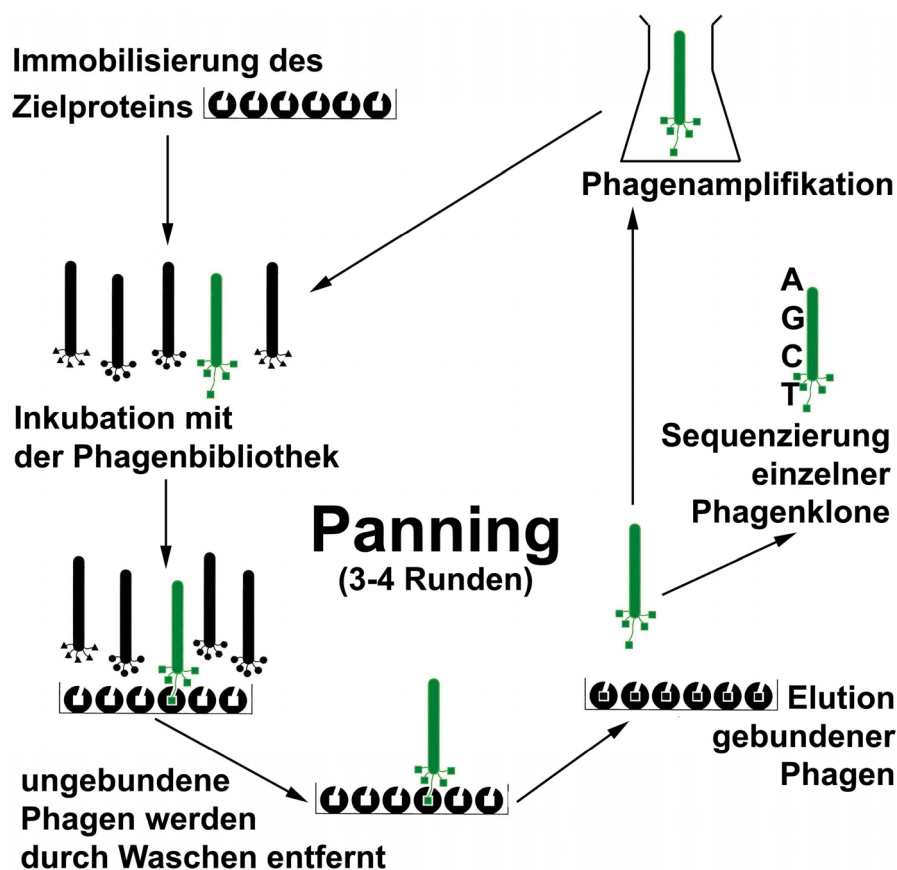


Abb. 1.4: Funktionsweise des als *Panning* bezeichneten Selektionsprozesses zur Isolierung spezifisch bindender Phagen aus dem Pool einer *Phage Display Library*

Das Zielprotein wird an eine Festphase gebunden und mit der Phagenbibliothek inkubiert. Anschließend werden ungebundene oder nur schwach bindende Phagen durch Waschen entfernt, wobei die Auswahl der Waschlösung die Stringenz des Prozesses beeinflusst. Nach Elution der gebundenen Phagen werden diese in *E. coli* vermehrt und die gebildeten Phagen aus dem Überstand der Bakterienkultur isoliert. Dieser Phagenpool wird in der nächsten Panningrunde zur Inkubation mit dem Zielprotein verwendet. So erfolgt nach 3 – 4 Zyklen eine Anreicherung spezifisch bindender Phagen. Einzelne Phagen der Panningrunden werden sequenziert. Durch die in diesem System vorliegende Kopplung des Phänotyps der Phagen mit ihrem Genotyp wird mit der bindungsaktiven Fraktion gleichzeitig auch die zugehörige Sequenzinformation erhalten.

Das *Phage Display* wurde zunächst als in vitro Selektions- und Reifungssystem von rekombinanten Antikörpern (Clackson *et al.* 1991; McCafferty *et al.* 1990) bzw. Antikörperfragmenten (Garrard & Henner 1993; Hoogenboom & Winter 1992) verwendet. Mittlerweile wurden *Phage Display Peptide Libraries* erfolgreich zur Identifikation von Liganden beispielsweise des Tumorsuppressors p53 (Böttger *et al.* 1997; Böttger *et al.* 1996; Daniels & Lane 1994; Stephen *et al.* 1995), der SH3-Domäne (Cheadle *et al.* 1994; Mongiovi *et al.* 1999; Rickles *et al.* 1994; Sparks *et al.* 1994) und des Urokinaserezeptors (Goodson *et al.* 1994; Ploug *et al.* 1998; Simon *et al.* 2000) verwendet. Dabei ließen sich neben linearen Epitopen auch bindende Peptide für Proteine selektionieren, die gegen ein diskontinuierliches oder konformationsabhängiges Epitop gerichtet waren. Damit stellt das *Phage Display Library Screening* eine innovative molekularbiologische Methode zur Identifizierung von Proteinbindungssequenzen dar, die in der vorliegenden Dissertation zur Isolierung von Glucokinase bindenden Peptiden eingesetzt wurde. Für den Selektionsprozeß wurde die *Phage Display* Peptidbibliothek Ph.-D.-12TM der Firma New England Biolabs, die eine variable Peptidsequenz von zwölf Aminosäuren als lineares Fusionsprotein mit dem Oberflächenprotein pIII exprimiert, verwendet.

1.11 Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen: Das Two Hybrid System

Die unter Verwendung des *Phage Display* Systems ermöglichte Identifizierung von Proteinbindungsmotiven der Glucokinase fordert gleichzeitig auch die Charakterisierung einer solchen Interaktion auf Proteinebene. Von Fields und Mitarbeitern wurde die

Methode des *Two Hybrid Systems* entwickelt, mit der Proteinwechselwirkungen *in vivo* getestet werden können (Fields & Song 1989). Der Vorteil dieser molekularbiologischen Technik ist es, daß sowohl bekannte Gene als auch Gendatenbanken eingesetzt werden können, die Reaktion, auf die selektioniert wird, jedoch auf Proteinebene *in vivo* abläuft. Dies wird durch die Expression aller Komponenten in Hefezellen ermöglicht. Nach Isolation des positiv reagierenden Hefeklons kann sofort eine Interaktion definiert werden bzw. bei Datenbanken auf das Gen des Wechselwirkungspartners zugegriffen werden (Fields & Sternglanz 1994). Die selektierbare Reaktion in der Hefezelle stellt die Expression spezieller Reportergene dar. Unter Verwendung des *Two Hybrid Systems* konnten sowohl bekannte Interaktionen bestätigt als auch schwache Interaktionen nachgewiesen werden, die zuvor mit *in vitro* Verfahren nicht detektierbar waren (Estojak *et al.* 1995; Guarente 1993). Nach Punktmutationen von für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren war es sogar möglich, das veränderte Interaktionsverhalten der Proteine zu charakterisieren (Yang *et al.* 1995). Da im *Two Hybrid System* bereits das Interaktionsverhalten der Hefehexokinase analysiert werden konnte (Müller *et al.* 1996), und auch eine Interaktion der Glucokinase mit dem Glucokinase-Regulatorprotein gezeigt werden konnte (Mookhtiar *et al.* 1996), besitzt diese Technik ein hohes Potential, Protein-Protein Interaktionen der Glucokinase zu identifizieren und charakterisieren.

Das in der vorliegenden Dissertation verwendete MATCHMAKER *Two Hybrid System* von Clontech basiert auf dem Hefetranskriptionsfaktor GAL4, der aus zwei separaten Domänen besteht. Dabei kann die direkte kovalente Bindung zwischen der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und der Aktivierungsdomäne (AD) durch andere Proteinabschnitte ersetzt werden (Brent & Ptashne 1985a; Brent & Ptashne 1985b). Mit Hilfe von Klonierungsvektoren werden Fusionsproteine dieser Domänen mit den zu untersuchenden Wechselwirkungspartnern erzeugt. Die Hefezellen, in denen die Fusionsproteine exprimiert werden, verfügen über zwei chromosomal integrierte Reportergene, ein Enzym des Histidinsyntheseweges (*HIS3*) und die β -Galaktosidase (*lacZ*). Die Aktivierung der Reportergene steht unter der Kontrolle eines zusammengesetzten Promotors aus der UAS (*Upstream Activating Sequence*) des Hefe GAL1 Promotors, an die die DNA-BD spezifisch bindet.

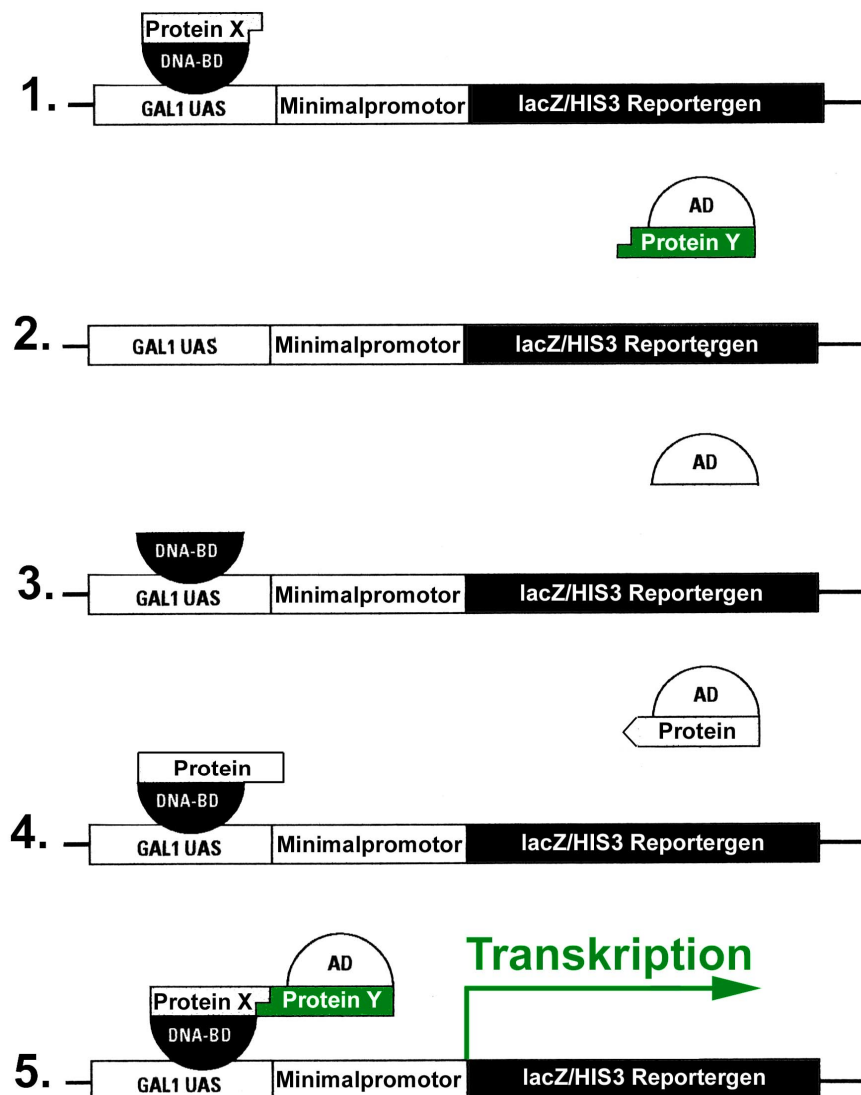


Abb. 1.5: Prinzip des *Two Hybrid* Systems zur Analyse von Proteininteraktionen

Das Prinzip einer *Two Hybrid* Proteininteraktion ist in Abbildung 1.5 schematisiert. Wenn das DNA-BD/ProteinX-Fusionsprotein alleine vorliegt, kann es nur an den Promotor binden, die Transkription aber nicht starten (1). Das AD/ProteinY-Fusionsprotein kann alleine nicht direkt an den Promotor binden (2). Auch die AD kann separat keine kovalente Bindung zur am Promotor gebundenen DNA-BD eingehen und die Transkription starten (3) (Ma & Ptashne 1988). Wenn die mit der DNA-BD und der AD exprimierten Fusionsproteine nicht miteinander interagieren, wird die Transkription nicht gestartet (4).

Nur eine Interaktion zwischen Protein X und Protein Y ersetzt die kovalente Bindung zwischen der an den Promotor gebundenen DNA-BD und der AD und aktiviert die Transkription der Reportergene (5). Dabei können X und Y sowohl für zwei bekannte Proteine stehen, deren Bindungsverhalten analysiert werden soll, oder aber für ein bekanntes Protein und einen aus einer Bibliothek identifizierten Interaktionspartner.

Die Aktivierung der Reportergene im Sinne einer positiven *Two Hybrid* Interaktion läßt sich für das *HIS3* Reportergen durch Selektion von Hefeklonen auf Histidinmangelnährmedium detektieren und für das *lacZ* Reportergen in qualitativen und quantitativen β -Galaktosidaseassays bestimmen.

1.12 Fragestellung

Die Glucokinase ist das Schlüsselenzym der glucoseinduzierten Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und des Glucosemetabolismus in der Leber. Es ist allgemein akzeptiert, daß Translokationsprozesse und intrazelluläre Kompartimentierung ein Regulationsprinzip der Glucokinase sowohl in der Leber als auch in der β -Zelle des Pankreas darstellen. Während in der Leber mit dem Glucokinase-Regulatorprotein ein spezifischer Interaktionspartner identifiziert wurde, ist der Mechanismus der Glucokinasebindung in der β -Zelle des Pankreas unklar. Zudem fehlen molekulare Detailkenntnisse über die Natur der Glucokinase-Glucokinase-Regulatorprotein Interaktion, die auch wertvolle Hinweise für die Bindung der Glucokinase an andere bislang unbekannte Proteine geben können.

In der vorliegenden Dissertation sollten unter Verwendung von neuen molekularbiologischen Methoden Interaktionspartner der Glucokinase identifiziert und charakterisiert werden.

1. Mit Hilfe des *Phage Display Peptide Library* Screenings sollten systematisch Peptidmotive identifiziert werden, die mit der Glucokinase interagieren.
2. Proteine mit einer potentiellen regulatorischen Funktion für die Glucokinase in den β -Zellen des Pankreas sowie der Leber sollten in vivo durch das *Two Hybrid* System auf ihre Bindungsfunktionalität hin überprüft werden.
3. Es sollten Domänen der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber charakterisiert werden, welche die Interaktion der beiden Proteine entscheidend vermitteln. Mutationsanalysen der identifizierten Aminosäuremotive sollten dabei zu einer Beschreibung der Bindungseigenschaften im *Two Hybrid* System eingesetzt werden.
4. Durch das systematische Screening einer *Two Hybrid cDNA Library* sollte geklärt werden, ob neben dem Glucokinase-Regulatorprotein als bekanntem Bindungspartner der Glucokinase weitere Interaktionspartner der Glucokinase existieren, die die intrazellulären Kompartimentierungsphänomene in der β -Zelle des Pankreas vermitteln.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

| | |
|--|--------------------------------------|
| ABTS (2', 2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid)) | Sigma, Taufkirchen |
| ATP (Adenosintriphosphat) | Boehringer, Mannheim |
| [γ - ³³ P]-dATP | Hartmann, Braunschweig |
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| Acrylamid/NN'-methylenbisacrylamid 37,5:1 40 % | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Agar | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Agarose | BioRad, München |
| Aldolase | Boehringer, Mannheim |
| 6-Aminohexansäure | Sigma, Taufkirchen |
| 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) | Sigma, Taufkirchen |
| Ammoniumacetat | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumpersulfat | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumsulfat | Merck, Darmstadt |
| Ampicillin | Boehringer, Mannheim |
| Anti-GAL 4 AD Antikörper (Maus) | Clontech, Palo Alto, USA |
| Anti-GAL 4 DNA-BD Antikörper (Maus) | Clontech, Palo Alto, USA |
| Anti-GST Antikörper (Ziege) | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Esel) | Dianova, Hamburg |
| Anti-Maus IgG Antikörper (Ziege) | Dianova, Hamburg |
| Anti M13 Antikörper (Maus) | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Anti Ziege IgG Antikörper (Esel) | Dianova, Hamburg |
| Bakto-Trypton | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Bakto-Yeast-Extrakt | GibcoBrl, Karlsruhe |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Blotting Papier GB 003 und GB 002 | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Sigma, Taufkirchen |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Serva, Heidelberg |
| Butanol | Merck, Darmstadt |
| <i>Centricon 10.000 MWCO Centrifugal Filter</i> | Millipore, Eschborn |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| CIAP (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>) | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Coomassie Brilliant Blue R 250 | Merck, Darmstadt |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma, Taufkirchen |
| <i>Droupout Supplemente</i> | Clontech, Palo Alto, USA |
| DTT (Dithiothreitol) | Sigma, Taufkirchen |
| <i>ECL-System (enhanced chemiluminescence)</i> | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| <i>E. coli (Escherichia coli) BL21</i> | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| <i>E. coli</i> ES1301mutS | Promega, Mannheim |
| <i>E. coli</i> JM109 | Stratagene, La Jolla, USA |
| <i>E. coli</i> XL1Blue | Stratagene, La Jolla, USA |
| EDTA | Sigma, Taufkirchen |
| Eisessig | Merck, Darmstadt |
| Elektroporationsküvetten, 2 mm Elektrodenabstand | BioRad, München |
| EMM Powder | Stratagene, La Jolla, USA |
| Entwickler LX 24 | Kodak, Rochester, USA |
| Ethanol | Baker, Deventer, Niederlande |
| Ethidiumbromid | Merck, Darmstadt |
| Filterpapiere | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Fixierer AL 4 | Kodak, Rochester, USA |
| FCS (Fötales Kälberserum) | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Fructose-6-phosphat | Boehringer, Mannheim |
| Fructose-2,6-bisphosphat | Sigma, Taufkirchen |
| <i>Galacto Star</i> Chemilumineszenz Assay | Tropix, Bedford, USA |
| G418 (Geneticin) | GibcoBrl, Karlsruhe |

| | |
|--|--------------------------------------|
| <i>Glass Beads</i> | Sigma, Taufkirchen |
| Glaskugeln 3mm | Roth, Karlsruhe |
| Glücksklee Magermilchpulver | Nestle AG, Frankfurt |
| Glutathion, reduziert | Sigma, Taufkirchen |
| Glutathion Sepharose 4B | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Glucose | Merck, Darmstadt |
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase | Sigma, Taufkirchen |
| Glycerol | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase | Sigma, Taufkirchen |
| Glycin | Merck, Darmstadt |
| HEPES (4-(-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure | Sigma, Taufkirchen |
| Herings-DNA (Desoxyribonukleinsäure) | Boehringer, Mannheim |
| Hybond N-Blotting-Membran | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Hypercassette-Autoradiographie-Kassette | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Hyperfilm MP und Hyperfilm β -max | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Immobilon-P-Transfer-Membran) | Millipore, Eschborn |
| Imidazol | Sigma, Taufkirchen |
| IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) | Biomol, Hamburg |
| Isoamylalkohol | Merck, Darmstadt |
| Isopropanol | Baker, Deventer, Niederlande |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Lactatdehydrogenase | Boehringer, Mannheim |
| Lithiumacetat | Sigma, Taufkirchen |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat | Merck, Darmstadt |
| Mercaptoethanol | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Methanol | Baker, Deventer, Niederlande |
| Mineralöl | Sigma, Taufkirchen |

| | |
|--|---|
| NADP (oxidiertes Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat) | Boehringer, Mannheim |
| NADH (reduziertes Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat) | Boehringer, Mannheim |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumcitrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt |
| Natrium-Laurylsarcosin | Sigma, Taufkirchen |
| Ni-NTA-Agarose | Qiagen, Hilden |
| Ni-NTA-His-Sorb-Strips | Qiagen, Hilden |
| Ni-NTA-Magnetic-Agarose-Beads | Qiagen, Hilden |
| Nonidet P40 (Nonylphenyl-polyethylenglycol) | Sigma, Taufkirchen |
| dNTP-Mix | Promega, Mannheim |
| Oligonukleotide | GibcoBrl, Karlsruhe MWG Biotech, Ebersberg |
| Orange G (8-(Benzolazol),7-hydroxyl, 1,3-naphthlindisulfonsäure) | Sigma, Taufkirchen |
| Penicillin | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Ph.-D.-12 TM Library | New England Biolabs, Schwalbach |
| Phenol | Merck, Darmstadt |
| Phosphoenolpyruvat | Boehringer, Mannheim |
| Phosphoglucose-Isomerase | Boehringer, Mannheim |
| Phosphorsäure | Merck, Darmstadt |
| Polyethylenglycol 4000 | Sigma, Taufkirchen |
| Polyethylenglycol 8000 | Sigma, Taufkirchen |
| Ponceau S-Konzentrat | Sigma, Taufkirchen |
| Protein-A-Agarose | Boehringer, Mannheim |

| | |
|---|---------------------------------|
| Pyrophosphat | Sigma, Taufkirchen |
| pyrophosphatabhängige PFK | Sigma, Taufkirchen |
| Pyruatkinase | Boehringer, Mannheim |
| QIAex II Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin M13 Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| <i>Rat Liver MATCHMAKER cDNA Library</i> | Clontech, Palo Alto, USA |
| Reacti Bind Glutathione Coated Strips | Pierce, Rockford, USA |
| Restriktionsenzyme | New England Biolabs, Schwalbach |
| | Fermentas, St.Leo-Rot |
| RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)- 1640 Medium | GibcoBrl, Karlsruhe |
| RPMI-1640 Medium, methioninfrei | GibcoBrl, Karlsruhe |
| R408 Helferphagen | Promega, Mannheim |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| Sarkosyl (Natrium-Laurylsarcosin) | Sigma, Taufkirchen |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Sigma, Taufkirchen |
| <i>S. cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Y190 | Clontech, Palo Alto, USA |
| <i>S. cerevisiae</i> CG1945 | Clontech, Palo Alto, USA |
| <i>S. pombe</i> SP-Q01 | Stratagene, La Jolla, USA |
| <i>Slide-A-Lyzer 10K Dialysis Cassettes</i> | Pierce, Rockford, USA |
| Spritzenvorfilter, steril, 0,2 µm Porengröße | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Streptomycin | GibcoBrl, Karlsruhe |
| Sucrose | GibcoBrl, Karlsruhe |
| T4-DNA-Ligase | GibcoBrl, Karlsruhe |
| T4-DNA-Polymerase | GibcoBrl, Karlsruhe |
| T4-Polynucleotidkinase | Fermentas, St.Leo-Rot |
| Taq-Polymerase | Fermentas, St.Leo-Rot |
| TEMED | GibcoBrl, Karlsruhe |
| (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin) | |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Tetracyclin | Merck, Darmstadt |
| <i>Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer</i> | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| <i>Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP</i> | |
| <i>T7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit</i> | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Thiamin | Sigma, Taufkirchen |
| Trans ³⁵ S Label | ICN, Eschwege |
| Triosephosphat-Isomerase | Sigma, Taufkirchen |
| Tris | Merck, Darmstadt |
| Triton X 100 | Sigma, Taufkirchen |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |
| Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurate) | Sigma, Taufkirchen |
| Vektor pAlter-1 | Promega, Mannheim |
| Vektor pACT2 | Clontech, Palo Alto, USA |
| Vektor pAS2-1 | Clontech, Palo Alto, USA |
| Vektor pCI | Clontech, Palo Alto, USA |
| Vektor pESP-1 | Stratagene, La Jolla, USA |
| Vektor GEX-6P-1 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid) | Fermentas, St.Leo-Rot |
| <i>Yeast nitrogen base without amino acids</i> | GibcoBrl, Karlsruhe |
| <i>Yes Powder</i> | Stratagene, La Jolla, USA |

Sterile Zellkulturgefäße und Plastiklaborartikel wurden von den Herstellern Biozym, Costar, Eppendorf, Greiner und Nunc bezogen.

Zur Datenverarbeitung wurde folgende Software verwendet: *Microsoft Word 2000*, *Microsoft Exel 2000*, *Adobe Photoshop 5.5*, *DNASIS 2.1*, *Graph Pad Prism 3.01*, *Chromas 1.6* und *EndNote 3*.

2.2 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Ausgangsvektoren mit den cDNA-Sequenzen der humanen β -Zell und Leber Glucokinase, des Glucokinase-Regulatorproteins der Rattenleber und der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase

Die cDNA der Leber- und der Pankreas-Isoform der menschlichen Glucokinase wurde freundlicherweise von Dr. M. A. Permutt, Washington School of Medicine, St. Louis, im Klonierungsvektor pBluescriptSK+ zur Verfügung gestellt; die cDNA des Glucokinase-Regulatorproteins der Rattenleber von Dr. E. Van Schaftingen, Universite Catholique de Louvain, Brüssel, im Klonierungsvektor pBluescriptSK+; die cDNA der Rattenleber 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase von Dr. A. J. Lange, University of Minnesota, Minneapolis, im Klonierungsvektor pET3a. Diese Klonierungsvektoren dienten als *template* (= Matrize) bei der Subklonierung der kodierenden cDNAs in die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die kodierenden Bereiche der genannten cDNAs amplifiziert. Bei der PCR fanden Composite-Primer Anwendung, mit denen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen an den Enden des PCR-Fragments angebracht wurden. Durch die Wahl von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsenzyme am 5'- und 3'-Ende der PCR-Fragmente war nach einem Restriktionsverdau eine in der Orientierung der cDNA festgelegte Subklonierung in den Vektor möglich. Die jeweiligen *forward* und *reverse composite* Primer trugen neben der kodierenden cDNA-Sequenz am 5'-Ende die Erkennungssequenz für die ausgewählten Restriktionsenzyme und mindestens fünf weitere Nukleotide, um die Effizienz des Restriktionsschnitts zu erhöhen. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit 0,2 μ l TaqPolymerase, 1 μ l dNTP Mix (10 mM pro Nukleotid) und je 50 pmol der Primer in Reaktionspuffer durchgeführt. Dabei waren 100 ng cDNA als *template* ausreichend. Der Reaktionsansatz wurde mit 50 μ l Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten der Proben in den Reaktionsgefäßen zu vermeiden. Im Thermoblock (*Trio* Thermoblock, Biometra) wurden nach einer initialen Denaturierung von 5 min bei 94 °C folgende drei Schritte 25 mal zyklisch wiederholt. Eine Denaturierung bei 94 °C von 1 min.

Darauf folgend für 1 min das Primerannealing bei einer um 5 – 10 °C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotids liegenden Temperatur. Und schließlich die Elongation bei 72 °C für 1 min/1000 bp. Die PCR wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 72 °C beendet. Bei der analytischen PCR fanden *forward* und *reverse* Primer Anwendung, die Oligonukleotidsequenzen von etwa 100 bp Abstand zur *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors trugen und so die Überprüfung der Subklonierung ermöglichten.

10x Reaktionspuffer (pH 8,8):

| | |
|--------|-----------------------------------|
| 160 mM | (NH ₄)SO ₄ |
| 15 mM | MgCl ₂ |
| 670 mM | Tris |
| 0,1 % | Tween 20 |

2.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller zugehörigen Puffersystem bei empfohlener Temperatur-, Mengen- und Zeitkonstante. Der Restriktionsverdau wurde bei unterschiedlichen Optima der beiden Enzyme separat mit eingefügter Aufreinigung durchgeführt. Neben dem präparativen Zweck der Restriktion wurden Restriktionsanalysen zur Überprüfung einer erfolgreichen Subklonierung durchgeführt.

2.2.4 Dephosphorylierung der kohäsiven Enden von Plasmiden

Durch die Inkubation mit alkalischer Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* CIAP) wurden die Phosphatreste an den 5'- und 3'-Enden der Plasmid-DNA abgespalten. Die Dephosphorylierung verhindert eine Religation des Vektors und erhöht damit die Effizienz der Subklonierung. Die Inkubation wurde mit 1 U CIAP in Reaktionspuffer bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Durch anschließendes Erhitzen bei 72 °C für 10 min wurde das Enzym inaktiviert.

10x Dephosphorylierungsspuffer (pH 8,5):

| | |
|--------|------|
| 500 mM | Tris |
| 1 mM | EDTA |

2.2.5 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung der DNA Fragmente erfolgte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben.

2.2.6 Ligation

Die komplementären kohäsiven Enden der jeweiligen cDNA und des Plasmids, die nach dem Restriktionsverdau entstanden sind, wurden im molaren Verhältnis von 3:1 für 16 h bei 16 °C ligiert. Die Inkubation von insgesamt 300 ng DNA erfolgte mit 0,1 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl.

10x Ligationspuffer (pH 7,5):

| | |
|--------|-------------------|
| 660 mM | Tris |
| 50 mM | MgCl ₂ |
| 10 mM | DTT |
| 10 mM | ATP |

2.2.7 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Die effiziente Transformation von *E. coli* Bakterien mit Nukleinsäuren erfordert eine Desintegration der Bakterienmembran. Neben dem chemischen Verfahren mit divalenten Kationen kann dies auch durch ein starkes elektrisches Feld erreicht werden. Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase müssen zuvor durch sequentielle Waschschrte in ein Medium mit geringem elektrischen Leitwert überführt werden. Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes (5 kV/cm) kann dann für 4 und 5 ms die Membran desintegriert werden, ohne daß die Bakterien absterben. Die Aufnahme von Fremd-DNA wird damit ermöglicht.

***E. coli* JM109**

endA, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*), *relA1*, *supE44*, *λ*⁻, *Δ(lac-proAB)*, [*F^c*, *traD36*, *proA⁺B⁺*, *lacI^qΔm15*]

***E. coli* XL1Blue**

recA1, *endA*, *gyrA96*, *thi-1* *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [*F^c*, *proA⁺B⁺*, *lacI^qΔm15*, *Tn10* (Tet^r)]

400 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer dichtbewachsenen *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde für weitere 3 – 4 h bis zu einer OD_{600 nm} von 0,7 im

Rundschüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis gekühlt, ehe die Bakterien 15 min bei 4 °C und 4000 g pelletiert wurden. Die Resuspendierung des Bakterienpellets erfolgte in 400 ml 10%igem (v/v) Glycerol. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 200 ml 10%iger (v/v) Glycerollösung aufgenommen. Es folgten zwei weitere Waschschrte, bestehend aus Zentrifugation und Resuspension in 10 ml und danach in 1 ml 10%igem (v/v) Glycerol. Nach dem letzten Waschschrte waren die Bakterien der 400 ml Kultur in 1 ml 10%iger (v/v) Glycerollösung konzentriert. Die Lagerung der in 60 µl Aliquots aufgeteilten Bakteriensuspension erfolgte bei -70 °C.

LB-Medium (pH 7,0):

| | |
|--|---------------------|
| 10 g | Bakto-Trypton |
| 5 g | Bakto-Yeast-Extrakt |
| 10 g | NaCl |
| Die Substanzen wurden in 1000 ml dd H ₂ O gelöst und anschließend autoklaviert. | |

2.2.8 Elektrotransformation

40 µl einer Suspension elektrokompenter *E. coli* Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biorad, 2 mm Elektrodenabstand) überführt. Jeweils 1 ng aufgereinigtes Plasmid bzw. 1 µl eines Ligationsansatzes (entsprechend etwa 50 ng DNA) wurde gut mit den elektrokompenten Bakterien durchmischt und für 4 – 5 ms einer elektrischen Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien in 0,5 ml SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu gewährleisten.

SOC-Medium (pH 7,0):

| | |
|------|---------------------|
| 20 g | Bakto-Trypton |
| 5 g | Bakto-Yeast-Extrakt |
| 5 g | NaCl |

Die Substanzen wurden in 950 ml dd H₂O gelöst. Anschließend wurden 2,5 mM KCl dazugegeben, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Vor dem Gebrauch wurde das Medium durch Zusatz von MgCl₂ und Glucose (Endkonzentration 5 mM und 20 mM) komplettiert.

Nach der Inkubation wurden 100 – 250 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Dabei bewirkt der Zusatz eines Antibiotikums zum Agarmedium, daß nur mit dem Plasmid transformierte Bakterien Kolonien auf dem Agar bilden können. Nach 12 h Bebrüten zeigten sich auf den Agarplatten antibiotikaresistente Klone, die auf das rekombinante Plasmid untersucht wurden.

LB-Agar:

| | |
|------|---------------------|
| 10 g | Bakto-Trypton |
| 5 g | Bakto-Yeast-Extrakt |
| 12 g | Agar |
| 10 g | NaCl |

Die Substanzen wurden in 1000 ml dd H₂O suspendiert und anschließend autoklaviert.

Die flüssige Agarlösung wurde langsam bis auf 50 °C abgekühlt, ehe die jeweiligen Antibiotika hinzupipettiert wurden. Für eine 9 cm Petrischale wurden je 20 ml Agarlösung verwendet. Die Agarplatten wurden bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert.

| | |
|-------------|-----------------------------|
| Ampicillin | Endkonzentration 50 µg/ml |
| Tetracyclin | Endkonzentration 12,5 µg/ml |

2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-, Maxiprep)

Unter den mit rekombinantem Plasmid transformierten Bakterien mußten die Klone identifiziert werden, die das gewünschte Plasmid korrekt amplifizierten. Hierfür wurden 5 – 15 Bakterienkolonien in 2 ml ampicillinhaltiges (50 µg Ampicillin/ml) LB-Medium überführt. Die Bakterienklone wuchsen für ca. 12 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator. Die Isolation der Plasmid-DNA aus 1,5 ml der Bakterienkultur erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben. Der Bakterienaufschluß beruht dabei auf einer alkalischen SDS-Lyse. Positive Klone wurden mit Glycerol stabilisiert und bei -70 °C aufbewahrt. Dazu wurden 150 µl Glycerol in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 850 µl der Übernachtskultur versetzt und gut gevortext. Zur Isolierung größerer hochreiner Plasmidmengen der verifizierten Plasmidkonstrukte wurden 20 µl des bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstocks in 250 ml LB-Medium unter Zusatz von 50 µg Ampicillin/ml 12 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben.

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Diese Methode wurde verwendet, um cDNA-Fragmente zu analysieren und zu isolieren. Die Agarosekonzentration lag je nach Größe der zu trennenden Fragmente bei 0,8 – 1,5 %. Die Agarose wurde in TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zur Fluoreszenzanfärbung der DNA-Banden zugesetzt. Die aufzutrennende DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 0,1 Vol. Orange G-Puffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von TBE-Puffer bei einer Spannung von 60 – 120 V (*Horizon 58* Elektrophoresekammer, GIBCO BRL). Als DNA-Längenstandard wurde zusätzlich eine 1 kb DNA-Leiter aufgetragen. Die jeweiligen cDNA-Fragmente wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm (UV-Transilluminator Vetter) sichtbar gemacht und für präparative Zwecke aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Dokumentation wurden die Gele mit dem Polaroid MP 4 Instant Camera System (Kodak) fotografiert.

TBE-Puffer (pH 8,3):

| | |
|--------|----------|
| 89 mM | Tris/HCl |
| 89 mM | Borsäure |
| 2,5 mM | EDTA |

Orange G-Puffer:

| | |
|-------------|------------------------|
| 50 % (w/v) | Sucrose |
| 1 % (w/v) | Natrium-Laurylsarcosin |
| 0,5 % (w/v) | Orange G |

Die Substanzen wurden in 6x TBE-Puffer gelöst und anschließend durch einen Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert.

2.2.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *QIAex II Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben.

2.2.12 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Quantifizierung der isolierten DNA erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm (*Lambda Bio* Spektralphotometer, Perkin Elmer; Quarzküvette, Hellma). Unter

Berücksichtigung einer 1:1000 Verdünnung entspricht 1 OD einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA. Zusätzlich kann durch Messung der Absorption bei 280 nm der Gehalt an verunreinigenden Proteinen innerhalb einer Probe bestimmt werden. Bei Plasmid-Isolierungen unter Verwendung der *Qiagen* Säulen wurden 260 nm/280 nm Extinktionssratio-Werte von 1,7 – 1,9 erreicht.

2.2.13 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden hauptsächlich nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Verwendet wurde der *Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* von Amersham Pharmacia Biotech. Die Detektion der Sequenzierungsprodukte erfolgte mit dem *dna Analyser Gene Reader 4200* von LiCor. Alle dafür verwendeten Primer waren am 5' Ende IRD 800 markiert und wurden von MWG Biotech bezogen. Einige Sequenzierungen erfolgten durch eine abgewandelte Methode nach Sanger unter Verwendung des *T7 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit* von Amersham Pharmacia Biotech und ³³P-dATP sowie Primern von GIBCO Life Technologies.

| | Oligonukleotidsequenz |
|----------------------|-----------------------------|
| <i>pAS2-1</i> | 5'AGTAGTAACAAAGGTCAAAGACA3' |
| <i>pACT2 forward</i> | 5'TACCACTACAATGGATGATGTA3' |
| <i>pACT2 reverse</i> | 5'GCACAGTTGAAGTGAAC3' |
| <i>pM13mp19</i> | 5'CCCTCATAGTTAGCGTAACG3' |
| <i>pAlter-GRP</i> | 5'AATCAGTTCTGACCACCA3' |

Tab. 2.1: Sequenzierprimer

2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinextrakten wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die diskontinuierliche, vertikale Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde das Tris-Glycin-SDS-Puffersystem und eine Minigel-Vertikalelektrophorese-Apparatur (Biometra *Minigel Twin*) verwendet.

| | |
|--|---|
| <u>Elektrodenpuffer:</u> | |
| 25 M | Tris |
| 200 mM | Glycin |
| 0,1% (w/v) | SDS |
| <u>10 % (w/v) Polyacrylamid-Trenngel:</u> | |
| 25 % (v/v) | 40 % Acrylamid/NN'-methylenbisacrylamid 37,5:1 |
| 20 % (v/v) | 1,88 M Tris/HCl (pH 8,8) |
| 20 % (v/v) | 0,5%ige (w/v) SDS-Lösung |
| 35 % (v/v) | dd H ₂ O |
| <u>5 % (w/v) Acrylamid-Sammelgel:</u> | |
| 12,5 % (v/v) | 40 % Acrylamid/NN'-methylenbisacrylamid 37,5:1 |
| 20 % (v/v) | 0,625 M Tris/HCl (pH 6,8) |
| 20 % (v/v) | 0,5%ige (w/v) SDS-Lösung |
| 47,5 % (v/v) | dd H ₂ O |

Hergestellt wurden Minigele (10 cm x 10 cm), die aus einem 10%igen (w/v) Acrylamid-Trenngel, über das ein 5%iges (w/v) Acrylamid-Sammelgel geschichtet wurde, bestanden. Zur Polymerisation wurden zu 10 ml Trenngel-Lösung 8 µl TEMED und 50 µl 10%iger (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung und zu 2 ml Sammelgel-Lösung 2 µl TEMED und 10 µl 10%iger (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung gegeben. Das Trenngel wurde bis zur Polymerisation mit 1 ml Butanol überschichtet. In das Sammelgel wurde ein 10er Kamm zur Ausbildung von Slots zu 15 µl eingebracht.

| | |
|--|----------------|
| <u>5x SDS-Loadingpuffer (pH 6,8):</u> | |
| 250 mM | Tris/HCl |
| 10 % (w/v) | SDS |
| 50 % (w/v) | Glycerol |
| 500 mM | DTT |
| 0,5 % (w/v) | Bromphenolblau |

Die Proben wurden im Verhältnis 4:5 mit dem SDS-Loadingpuffer versetzt, für 2 min bei 95 °C denaturiert und aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte innerhalb des Sammelgels bei einem Stromfluß von 20 mA und innerhalb des Trenngels mit 40 mA. Die Größenzuordnung der Proteinbanden erfolgte durch einen mitlaufenden

Molekulargewichtsmarker (10 kDa Protein-Leiter). Das Gel wurde anschließend entweder in einer Färbelösung mit Coomassie Blau gefärbt und zur Dokumentation auf Transferpapier getrocknet oder auf eine PVDF-Membran durch *Semidry Blotting* übertragen.

Färbelösung:

0,01 % Coomassie Blau R-250 in H₂O : Methanol : Essigsäure (6:3:1 v)

Entfärbelösung:

H₂O : Methanol : Essigsäure (6:3:1 v)

2.3.2 Western Blot-Transfer

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch ein diskontinuierliches *Semidry Blotting* Verfahren (*Semidry Blotter*, Biorad) nach Westermaier (1990) auf eine PVDF-Membran (*Immobilon-P Transfer Membran*, Millipore) transferiert. Das Blotting System hatte folgenden Aufbau: -- Anode -- 4 Blotting Papiere (*GB003*, Schleicher und Schuell, Dassel) getränkt mit Anodenpuffer 1 -- 2 Blotting Papiere getränkt mit Anodenpuffer 2 -- PVDF-Membran (Die Membran wurde zuvor 1 – 2 min in Methanol äquilibriert, anschließend in dd H₂O gewaschen und dann in Anodenpuffer 2 gelegt.) -- Polyacrylamidgel -- 4 Blotpapiere getränkt mit Kathodenpuffer -- Kathode.

Anodenpuffer 1:

| | |
|--------------|-------------|
| 0,3 M | Tris |
| 0,01 % (w/v) | Natriumazid |
| 20 % (v/v) | Methanol |

Anodenpuffer 2:

| | |
|--------------|-------------|
| 25 mM | Tris |
| 0,01 % (w/v) | Natriumazid |
| 20 % (v/v) | Methanol |

Kathodenpuffer:

| | |
|--------------|-------------------|
| 40 mM | 6 Aminohexansäure |
| 0,01 % (w/v) | SDS |
| 0,01 % (w/v) | Natriumazid |
| 20 % (v/v) | Methanol |

Der Transfer erfolgte bei 140 mA und 30 V für eine Stunde. Durch anschließende Färbung der PVDF-Membran mit einer 0,2%igen Ponceau S-Lösung für 3 min wurde die Effizienz des Transfers kontrolliert. Die Positionen der Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden für spätere Vergleiche auf der Membran markiert. Die Membran wurde danach durch Waschen mit PBST entfärbt.

2.3.3 Western Blot-Hybridisierung

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 1 h bei 37 °C oder 12 h bei 4 °C in 20 ml Blockierungslösung inkubiert.

| | |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| <u>Blockierungslösung:</u> | |
| 5 % (w/v) | Magermilchpulver |
| Das Milchpulver wurde in PBST gelöst. | |
| <u>PBST (pH 7,4):</u> | |
| 137 mM | NaCl |
| 2,7 mM | KCl |
| 8,1 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 1,8 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 0,05 % (v/v) | Tween 20 |

Die Membran wurde dann dreimal für 10 min in PBST gewaschen. Anschließend erfolgte die entsprechende Inkubationszeit mit einem für das jeweilige Protein spezifischen Antikörper. Der Antikörper wurde wie vorgeschrieben in PBST unter Zusatz von 0,1 % BSA verdünnt. Die Membran wurde danach dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und mit einem entsprechenden peroxidasemarkierten Sekundärantikörper, der in PBST unter Zusatz von 0,1 % BSA verdünnt wurde, für 1 h bei RT inkubiert.

| Primärantikörper: | Sekundärantikörper: |
|--|---|
| Anti-Rattenleber-Glucokinase-Antikörper vom Kaninchen 1:20000 / Inkubationszeit: 3 h | Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper des Esels 1:15000 / Inkubationszeit: 1h |
| GAL4 DNA-BD monoklonaler Antikörper von der Maus 0,4 µg/ ml / Inkubationszeit: 2,5 h | Anti-Maus-IgG-Antikörper der Ziege 1:10000 / Inkubationszeit: 1h |
| GAL4 AD monoklonaler Antikörper von der Maus 0,5 µg/ ml / Inkubationszeit: 2,5 h | Anti-Maus-IgG-Antikörper der Ziege 1:10000 / Inkubationszeit: 1h |
| Anti-GST Antikörper von der Ziege 1:1500 / Inkubationszeit: 3 h | Anti-Ziege-IgG-Antikörper des Esels 1:20000 / Inkubationszeit: 1 h |

Mit den Reagenzien des *ECL*-Systems konnte die jeweilige Proteinexpression spezifisch durch Chemilumineszenzdetektion auf einem Autoradiographiefilm (*Hyperfilm MP*) dokumentiert werden. Die Expositionszeiten des Films wurden entsprechend der Antikörper gewählt.

2.3.4 Proteinbestimmung mit der *Bradford*-Methode

Der Proteingehalt der Eluate wurde mittels der *Bradford*-Methode (Pierce, Rockville, USA) in Einmalküvetten ermittelt. Als Standard dienten BSA-Lösungen (in 0,9%iger NaCl-Lösung) der Konzentrationen 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 µg BSA/ml Lösung. Je 100 µl Standard oder die entsprechende Probe wurden mit 1 ml *Bradford*-Reagenz gemischt und die Extinktion bei 590 nm im Photometer bestimmt.

Bradford-Reagenz:

| | |
|--------------|--------------------------------|
| 0,01 % (w/v) | Coomassie Brilliant Blue G-250 |
| 5 % (v/v) | Ethanol |
| 10 % (v/v) | Phosphorsäure |
| 85 % (v/v) | bidest. Wasser |

2.4 Methoden zur Koimmunopräzipitation

2.4.1 RINm5F-GK Zellen

Für diese Arbeit wurde eine insulinsezernierende permanente Zellkulturlinie der Ratten-Insulinomzellen (RIN) m5F verwendet, in die am Institut für Klinische Biochemie nach dem beschriebenen Verfahren von GIBCO, Life Technologies zum *LipofectamineTM Reagent* Glucokinase transfiziert wurde.

2.4.2 Kultivierung der RINm5F-GK Zellen

Die glucokinasetransfizierten RINm5F-GK Zellen wurden als Monolayer-Kultur in 10 mM glucosehaltigem RPMI-Medium 1640, dem 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin (1 U/1 µg) und 0,2 % einer 25 M Lösung des Antibiotikums Geneticin[®] (G418) zugesetzt war, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im Zellkulturinkubator. Die Zellen wurden zur Erhaltung in sterilen 75 cm³ Gewebekulturflaschen und für die jeweiligen Experimente in

sterilen Gewebekulturschalen ausgesät. Alle 72 h wurde das Medium erneuert. Eine Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich. Diese Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt.

2.4.3 Zellpassagierung

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 4 ml PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,025 %/0,1 %) versetzt und im Brutschrank bei 37 °C für 5 min inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vollständig abgelöst, woraufhin das Trypsin mit 5 ml FCS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml RPMI 1640 Medium gründlich resuspendiert. Die Zellzahl wurde wie unten beschrieben ermittelt und das notwendige Volumen für die Einsaat der gewünschten Zellzahl berechnet.

PBS (pH 7,4):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 137 mM | NaCl |
| 2,7 mM | KCl |
| 8,1 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 1,8 mM | KH ₂ PO ₄ |

Die Lösung wurde autoklaviert.

EDTA-Stammlösung:

| | |
|-------------|------|
| 2,0 % (w/v) | EDTA |
|-------------|------|

Das EDTA wurde in sterilem PBS gelöst. Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Lagerung: in 5 ml Aliquots bei -20 °C

Trypsin-EDTA-Lösung:

| | |
|-------|----------------------------------|
| 10 ml | 0,25 % (w/v) Trypsin-Stammlösung |
| 5 ml | 2 % (w/v) EDTA-Stammlösung |
| 85 ml | PBS |

Lagerung: bei -20 °C

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer

Die Zellkonzentration in einer Suspension wurde mittels eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Die Methode beruht auf der mikroskopischen Zellzählung in

einem definierten Volumen der Zellsuspension. Die Neubauerkammer besteht aus 16 Quadraten, wobei jedes Quadrat eine Fläche von 1 mm^2 hat. Dies ergibt bei einer Tiefe von $0,1\text{ mm}$ ein Volumen von $0,1\text{ }\mu\text{l}$. Die Multiplikation des berechneten Mittelwerts mit 10^4 ergibt somit die Zellzahl/ml. Das Volumen der Zellsuspension multipliziert mit der Zellzahl/ml ergibt die Gesamtzellzahl.

2.4.5 Einbau von [^{35}S] L-Methionin in RINm5F-GK Zellen

Zur Detektion der von RINm5F-GK Zellen gebildeten Proteine im Autoradiogramm wurde eine Markierung mit Trans ^{35}S Label gewählt. Es wurden 35 mm Gewebekulturschalen mit je 150.000 Zellen RINm5-GK für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Kompletmedium gegen 2 ml methioninfreies glucosehaltiges RPMI 1640 (mit FCS, Penicillin/Streptomycin, G 418) zur Vorinkubation ausgetauscht, um einen effizienten Einbau des radioaktiv markierten L-Methionins in die gebildeten Proteine zu erreichen. Nach 1 h wurde das Medium entfernt und die Zellen für 0 h (Kontrolle), 0,5 h, 1 h und 3 h mit 330 μl Inkubationslösung überschichtet.

Inkubationslösung:

210 μCi

1 ml

Trans ^{35}S Label

methioninfreies glucosehaltiges RPMI 1640
(mit FCS, Penicillin/Streptomycin, G 418)

Dann wurde die Lösung abgezogen und es erfolgte eine zweistündige Folgeinkubation in RPMI 1640 Medium. Damit wurde erreicht, daß während der Inkubation gebildete Proteine komplettiert wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 300 μl PBS unter Zusatz von 0,5 % TritonX 100 lysiert. Nach Zentrifugation mit 12.000 g für 10 min wurde der Überstand zur dreifachen Menge Aceton gegeben und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 μl SDS Loadingpuffer aufgenommen. Davon wurden 9 μl der Lösung in der SDS-Page aufgetrennt, durch *Semidry Blotting* auf PVDF-Membran transferiert und auf einem Kodak Bio Max Autoradiographiefilm dokumentiert. 1 μl Lösung wurde zu 5 ml Flüssigszintillator (HiSafe, Wallac) in ein Zählröhrchen pipettiert. Die Menge des eingebauten [^{35}S] L-Methionin konnte im β -Szintillationszähler (Wallac Wizard 1400) quantifiziert werden.

2.4.6 Immunopräzipitation der Glucokinase aus einem Lysat von RINm5F-GK Zellen unter Verwendung von Protein A-Agarose

Die Immunopräzipitation ermöglicht die Selektion eines Protein-Antikörperkomplexes aus einer Proteinmischung durch Bindung des Immunglobulins an Protein A-Agarose. Zur Glucokinasepräzipitation wurde Anti-Rattenleber-Glucokinase-Antikörper enthaltendes Kaninchenserum verwendet, welches im Institut für Klinische Biochemie erzeugt wurde. Eine dem Kaninchen vor der Immunisierung entnommene Serumprobe diente als Präserum der Kontrollreaktion. Es wurden 60 mm Gewebekulturschalen mit je 600.000 Zellen RINm5F-GK für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Komplettmedium gegen 5 ml methioninfreies glucosehaltiges RPMI 1640 (mit FCS, Penicillin/Streptomycin, G 418) zur Vorinkubation ausgetauscht. Nach 1 h wurde das Medium entfernt und die Zellen für 1 h mit 1 ml Inkubationslösung überschichtet. Dann wurde die Lösung abgezogen und es erfolgte eine dreistündige Folgeinkubation in RPMI 1640 Medium. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde 1 ml kalter Lysispuffer zugesetzt, die Zellen vollständig von der Gewebekulturschale entfernt und die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt.

Lysispuffer/Waschpuffer 1 (pH 7,5):

| | |
|-------------|-------------|
| 50 mM | Tris |
| 150 mM | NaCl |
| 1 % (v/v) | Nonidet P40 |
| 0,5 % (v/v) | Tween 20 |

Waschpuffer 2 (pH 7,5):

| | |
|--------------|-------------|
| 50 mM | Tris |
| 500 mM | NaCl |
| 0,1 % (v/v) | Nonidet P40 |
| 0,05 % (v/v) | Tween 20 |

Waschpuffer 3 (pH 7,5):

| | |
|--------------|-------------|
| 50 mM | Tris |
| 0,1 % (v/v) | Nonidet P40 |
| 0,05 % (v/v) | Tween 20 |

Nach Zentrifugation mit 12.000 g für 10 min wurde dem Überstand 50 µl homogenisierte Protein A-Agarose zugesetzt und unter Schütteln bei 4 °C über Nacht inkubiert. Diese als *Preclearing* bezeichnete Inkubationsphase führte zu einer Reduzierung unspezifisch an die Agarose gebundener Proteine während der Immunopräzipitation. Anschließend wurde mit

12.000 g bei 4 °C für 20 sec zentrifugiert und zum Überstand 5 µl Serum oder 5 µl Präserum zugesetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zusatz von 50 µl Protein A-Agarose erfolgten weitere 3 h der Inkubation. Dann wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet jeweils zweimal in Waschpuffer 1 – 3 gewaschen. Dabei wurde die Suspension jeweils für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl SDS Loadingpuffer aufgenommen und 3 min bei 100 °C erhitzt. 10 µl des Überstands wurden in der SDS-Page aufgetrennt, durch *Semidry Blotting* auf PVDF-Membran transferiert und auf einem Kodak Bio Max Autoradiographiefilm dokumentiert.

2.5 Methoden des „Phage Display“ Systems

2.5.1 Ph.-D.-12TM Phage Display Peptide Library von New England Biolabs

Die Phage Display Peptidbibliothek Ph.-D.-12TM der Firma New England Biolabs exprimiert eine variable Peptidsequenz von zwölf Aminosäuren als lineares Fusionsprotein mit dem Oberflächenprotein p III des Bakteriophagen M 13. Ein Spacer aus vier Aminosäuren zwischen der p III Sequenz und den zwölf Aminosäuren ermöglicht eine effektive Präsentation des Peptids. Die Library besteht aus $1,9 \times 10^9$ verschiedenen Peptidsequenzen. In Kontrollexperimenten zeigte die Library eine hohe Sequenzvariabilität und keine Anreicherung spezieller Sequenzen. Die Verteilung der einzelnen Aminosäuren entsprach der erwarteten Häufigkeit. Die Phage Peptide Library wurde in TBS mit 50 % Glycerol geliefert und bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Immobilisierung von His₆-Tag humaner β-Zell Glucokinase an Ni-NTA- *HisSorb-Strips* der Firma Qiagen

Es handelt sich bei den Ni-NTA-*HisSorb-Strips* um Polystyrol-8-*Well-Strips* (Nunc-ImmunoSorb), deren innere Oberfläche mit Ni-NTA (*Nickel nitrilotriacetic acid*) beschichtet ist. Proteine und Peptide mit His₆-Tag können auf der Oberfläche dieser *Microwell-Strips* ohne Funktionsverlust immobilisiert werden. Ein zwischen Oberfläche und Ni-NTA-Gruppe angefügter *Linker* ermöglicht eine optimale sterische Zugänglichkeit der gebundenen Proteine. Die Bindungskapazität beträgt pro *Well* etwa 20 pmol für Peptide sowie bis zu 10 pmol für kleinere Proteine. Bei größeren Proteinen nimmt sie aufgrund der

sterischen Hinderung deutlich ab. Um eine bestmögliche Präsentation der humanen β -Zell Glucokinase zu erreichen, wurde der Ni-NTA-*HisSorb-Strip* mit einem Überschuß des Proteins über Nacht unter Schütteln inkubiert.

2.5.3 Immobilisierung von GST-*tag* Rattenleber Glucokinase-Regulatorprotein an *Reacti-Bind Glutathione Coated Strips* der Firma Pierce

Es handelt sich bei den *Reacti-Bind Glutathione Coated Strips* um Polystyrol-8-*Well-Strips*, an deren innerer Oberfläche Glutathion über die zentrale Sulfhydrylgruppe gebunden vorliegt. Auf der Oberfläche dieser *Microwell-Strips* können Proteine mit GST-*Tag* immobilisiert werden. Die Bindungskapazität beträgt pro *Well* etwa 10 ng für Glutathion-S-Transferase, nimmt aber bei größeren GST-Fusionsproteinen aufgrund der sterischen Hinderung deutlich ab.

2.5.4 Isolierung bindender Phagen durch *Panning*

Die Anreicherung antigenbindender, peptidpräsentierender Phagen in einem Selektionsprozeß wird als *Panning* bezeichnet. Es wurden in den einzelnen Experimenten 3 – 4 *Pannings* durchgeführt. Zur Immobilisierung des Zielproteins wurde ein Ni-NTA-*HisSorb-Strip*/ *Reacti-Bind Glutathione Coated Strip* mit 200 μ l Inkubationslösung 1, 2 oder 3 pro *Well* versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Inkubationslösung abgegossen und der *Strip* auf ein Papier geklopft, um Überreste der Lösung zu entfernen. Die *Wells* wurden dann mit je 300 μ l Blockingpuffer versetzt, um nicht mit Protein besetzte Oberflächen abzusättigen. Der *Strip* wurde anschließend 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Abgießen des Blockingpuffers wurden die *Wells* 6 x mit je 300 μ l TBST gewaschen.

Phagen:

1. Panning: 4×10^{10} Phagen

weitere Pannings: $1-2 \times 10^{11}$ Phagen

Die Phagen wurden in der vorgegebenen Konzentration in TBST aufgenommen und 100 μ l der Lösung pro *Well* pipettiert. Zur Phageninkubation wurde der Ni-NTA-*HisSorb-Strip*/ *Reacti-Bind Glutathione Coated Strip* 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Abgießen der Inkubationslösung wurden die *Wells* zur Entfernung nicht gebundener Phagen 10 x mit je 300 μ l TBST gewaschen. Die Elution spezifisch gebundener Phagen

erfolgte durch Absenkung des pH-Werts oder durch Inkubation mit löslichem Antigen. Dazu wurden die *Wells* mit 100 µl Inkubationslösung 4 inkubiert. Zur pH-Elution wurden die *Wells* mit je 100 µl Glycin-Lösung versetzt und der *Strip* 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte die Neutralisierung der Lösung mit 15 µl Tris-Lösung pro *Well*. Die vereinigten Lösungen der *Wells* stellten das **Panningeluat** dar.

Inkubationslösung 1:

| | |
|----------|---|
| 50 µg/ml | His ₆ -Tag humane β-Zell Glucokinase |
| 0,1 M | NaHCO ₃ |

Inkubationslösung 2:

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| 200 ng/ml | GST-Tag Glucokinase-Regulatorprotein |
| 0,1 M | NaHCO ₃ |

Inkubationslösung 3:

| | |
|-----------|--------------------|
| 200 ng/ml | GST |
| 0,1 M | NaHCO ₃ |

Inkubationslösung 4:

| | |
|-----------|---|
| 200 µg/ml | His ₆ -Tag humane β-Zell Glucokinase |
| 0,1 M | NaHCO ₃ |

TBS (pH 7,5):

| | |
|--------|------|
| 50 mM | Tris |
| 150 mM | NaCl |

Die Lösung wurde autoklaviert.

TBST:

| | |
|------------|----------|
| 0,1% (v/v) | Tween 20 |
|------------|----------|

Das Tween 20 wurde in TBS gelöst.

Blockingpuffer (pH 8,6):

| | |
|----------|--------------------|
| 0,1 M | NaHCO ₃ |
| 5 mg/ ml | BSA |
| 0,02 % | NaN ₃ |

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Glycin-Lösung (pH 2,2):

| | |
|----------|--------|
| 0,2 M | Glycin |
| 1 mg/ ml | BSA |

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Tris-Lösung (pH 9,1):

| | |
|-----|------|
| 1 M | Tris |
|-----|------|

Die Lösung wurde autoklaviert.

2.5.5 Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters

Es wurden 10 µl *E. coli* ER2537 Bakterien aus einem bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstock in 10 ml LB Medium über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 vermehrt. Anschließend wurden Röhrchen mit 200 µl *E. coli* ER2537 Kultur vorbereitet. Die Agarose Top wurde in der Mikrowelle geschmolzen, zu 3 ml aliquotiert und in einem 45 °C warmen Wasserbad aufbewahrt. Die LB Agarplatten wurden mit einem Mix aus 8 µl IPTG in 40 µl Xgal beschichtet und 1 h bei 37 °C inkubiert. Von der zu bestimmenden Phagenlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils 10 µl der einzelnen Verdünnungen für 5 min bei Raumtemperatur in den vorbereiteten *E. coli* ER2537 Kulturröhrchen inkubiert.

Verdünnungsreihen:

Amplifiziertes Phageneluat: 10⁸-10¹¹

Panningeluat: 10¹-10⁴

Die infizierten Bakterien wurden zu den 3 ml 45 °C warmer Agarose Top gegeben, gut gemischt und auf die vorbereiteten LB/IPTG/Xgal Agarplatten gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten maximal 18 h bei 37 °C inkubiert.

Agarose Top:

| | |
|--------|--|
| 2,5 g | Bacto-Tryptone |
| 1,25 g | Bacto-Yeast-Extrakt |
| 1,25 g | NaCl |
| 0,25 g | MgCl ₂ x 6 H ₂ O |
| 1,75 g | Agarose |

Die Substanzen wurden in 250 ml dd H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

Xgal-Lösung:

| | |
|-------|--|
| 1 g | Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid) |
| 50 ml | Dimethylformamid |

IPTG-Lösung:

| | |
|-------|-------------------------------------|
| 1 g | IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) |
| 10 ml | dd H ₂ O |

In dem auf der Agarplatte wachsenden Bakterienrasen erscheinen phageninfizierte Bakterienklone als transparente Stellen, die als Plaques bezeichnet werden. Da die Phagen der Library Derivate des *lacZ*-Gen enthaltenen Plasmids M13mp19 sind, bilden diese auf

IPTG/Xgal Agarplatten blaue Plaques. Bei der jeweiligen Platte der Verdünnungsreihe mit ca. 100 Plaques wurden die blauen Plaques ausgezählt und der Phagentiter in pfu (*plaque forming units*)/10µl bestimmt.

2.5.6 Amplifikation der eluierten Phagen des Panningeluats

Es wurden 10 µl *E. coli* ER2537 Bakterien aus einem bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstock in 20 ml LB Medium bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator für 6 h vermehrt. Das die eluierten Phagen enthaltende Panningeluat wurde der Kultur zugesetzt und diese für weitere 4,5 h geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien mit 14.000 g bei 4 °C 10 min abzentrifugiert und der Überstand durch erneutes Zentrifugieren vollständig von den Bakterien befreit.

***E. coli* ER2537**

F' lacI^q Δ (lacZ) M15 proA⁺B⁺/fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB) Δ (hsdMS-mcrB)5 (r_k⁻m_k⁻McrBC⁻)

2.5.7 Isolierung der amplifizierten Phagen durch PEG/NaCl-Präzipitation

Die PEG/NaCl-Lösung wurde in einer Menge von 1/6 des Gesamtvolumens des Phagenüberstands zupipettiert, gut gemischt und zur Fällung über Nacht bei 4 °C stengelassen. Das Phagenpräzipitat wurde durch zweimalige Zentrifugation für 15 min bei 14.000 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde nach Entfernen des Überstands in 200 µl 0,02 % NaN₃ in TBS aufgenommen und mit 14.000 g bei 4 °C 5 min zentrifugiert. Der Überstand stellte das **amplifizierte Phageneluat** dar.

PEG/NaCl-Lösung:

| | |
|------------|----------|
| 20 % (w/v) | PEG-8000 |
| 2,5 M | NaCl |

2.5.8 Amplifikation von isolierten Phagenklonen

Es wurden 10 µl *E. coli* ER2537-Bakterien aus einem bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstock in 10 ml LB Medium über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Anschließend wurde die Kultur 1:100 in LB Medium verdünnt und Röhrchen zu 1 ml vorbereitet. Die *E. coli* ER2537 Kulturen wurden mit einzelnen Plaques aus dem Panningeluat infiziert und weitere 5 h geschüttelt. Nach Zentrifugation bei

10.000 g und 4 °C für 30 sec wurde der Überstand mit den Phagenpartikeln abpipettiert, 1:2 mit Glycerol verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt. 5 µl dieser Phagensuspension wurden zur Infektion der Bakterienkultur bei erneuter Amplifikation des Phagenklons verwendet. Aus dem Phagenüberstand erfolgte dann die Isolierung von einzelsträngiger DNA.

2.5.9 Aufreinigung von einzelsträngiger DNA aus Phagen zur Sequenzierung

Die Aufreinigung von einzelsträngiger DNA erfolgte mit dem *QIAprep Spin M13 Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben.

2.5.10 Amplifikation von Phagenklonen für Bindungsexperimente

Es wurden 10 µl *E. coli* ER2537-Bakterien aus einem bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstock in 10 ml LB Medium über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Anschließend wurde die Kultur 1:100 in LB Medium verdünnt. Zu 20 ml dieser *E. coli* ER2537 Kultur wurden 5 µl einer bei Raumtemperatur aufgetauten Phagensuspension des entsprechenden Klons gegeben und für 5 h weitergeschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien mit 14.000 g bei 4 °C 10 min abzentrifugiert und der Überstand durch erneutes Zentrifugieren vollständig von den Bakterien befreit. Die Isolierung der amplifizierten Phagen erfolgte durch PEG/NaCl-Präzipitation.

2.5.11 Charakterisierung der Bindungsaffinität von Phagenklonen durch ELISA

Ein Ni-NTA-*HisSorb-Strip/ Reacti-Bind Glutathione Coated Strip* wurde mit 200 µl Inkubationslösung 1, 2 oder 3 oder zur Kontrollreaktion mit 2,5 % Milchpulver in TBS pro *Well* versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Inkubationslösung abgegossen und der *Strip* auf ein Papier geklopft, um Überreste der Lösung zu entfernen. Die *Wells* wurden mit je 300 µl 2,5 % Milchpulver in TBS versetzt und der *Strip* 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Abgießen der Lösung wurden die *Wells* 6 x mit je 300 µl TBST gewaschen. Die Phagen wurden in TBST aufgenommen und seriell verdünnt. Pro *Well* wurden 200 µl jeder Verdünnung pipettiert. Der Ni-NTA-*HisSorb-Strip* wurde 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und die *Wells* nach dem Abgießen der Inkubationslösung 10 x mit je 300 µl TBST gewaschen. Pro *Well* wurden dann 200 µl Antikörper-Lösung pipettiert und der Ni-NTA-*HisSorb-Strip/ Reacti-Bind Glutathione Coated Strip* bei Raumtemperatur 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach

dem Abgießen der Lösung wurden die *Wells* 6 x mit je 300 µl TBST gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl pro *Well* ABTS-Lösung wurde der Ni-NTA-*HisSorb-Strip/ Reacti-Bind Glutathione Coated Strip* bei Raumtemperatur 20 min gelagert und die Absorption bei 405 nm im Mikroplattenphotometer gemessen.

Antikörper-Lösung:

HRP (*horseradish peroxidase*) konjugierter Anti M13 monoklonaler Antikörper 1:1000 verdünnt in TBST

ABTS-Lösung (pH 4,0):

0,22 mg /ml

ABTS

0,05 M

Natriumcitrat

Es wurden jeweils 1,7 µl 30 % H₂O₂/ml frisch zugesetzt.

2.6 Vektorgestützte sequenzspezifische Mutagenese im Altered Sites II Verfahren

2.6.1 Sequenzspezifische Mutagenese des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber

Die sequenzspezifische Mutagenese (*Site Directed Mutagenesis*) ermöglicht eine spezifische Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins. Hierzu läßt man die einzelsträngige nicht-mutierte DNA (Wildtyp-DNA) mit einem komplementären synthetischen Oligonukleotid, das die Mutation trägt, hybridisieren. Der komplementäre Strang wird *in vitro* durch DNA-Polymerasen synthetisiert und durch eine DNA-Ligase ligiert. Zur Mutagenese des GRP wurde das vektorgestützte Verfahren des *Altered Sites II in vitro Mutagenesis Systems* (Promega) angewendet. Das effiziente System beruht auf dem Vektor pAlter-1, in dem das β-Lactamasegen durch eine Deletionsmutation inaktiviert ist und die transformierten Bakterien gegenüber Ampicillin empfindlich sind. Die Selektion der transformierten Klone erfolgt über ein intaktes Tetracyclinresistenzgen. Im Mutageneseprozeß wird simultan neben dem Mutagenese-Oligonukleotid für die subklonierte cDNA ein *Tetracyclin Knockout*-Oligonukleotid zur Inaktivierung der Tetracyclinresistenz und ein *Ampicillin Repair*-Oligonukleotid eingesetzt, das eine Selektion positiver Mutanten durch eine wiederhergestellte Resistenz gegen Ampicillin erlaubt. Die Subklonierung der kodierenden cDNA des GRP in den Vektor pAlter erfolgte

unter Verwendung der angegebenen PCR Primer und der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*II.

| | Oligonukleotidsequenz |
|----------------|--|
| <i>forward</i> | 5'GTACAGGATCC <u>ATGCCAGGCACCAAACGA</u> 3' |
| <i>reverse</i> | 5'GTACAGTCGACTCAATTCAGGGTCCCACAGG3' |

Tab. 2.2: Primer für die Klonierung der Glucokinase-Regulatorprotein cDNA-Sequenz in den Vektor pAlter

Die unterstrichenen Nukleotide geben den kodierenden Bereich der *Composite*-Primer an. Die kursivgedruckten Nukleotide beschreiben den Erkennungsbereich der Restriktionsendonukleasen.

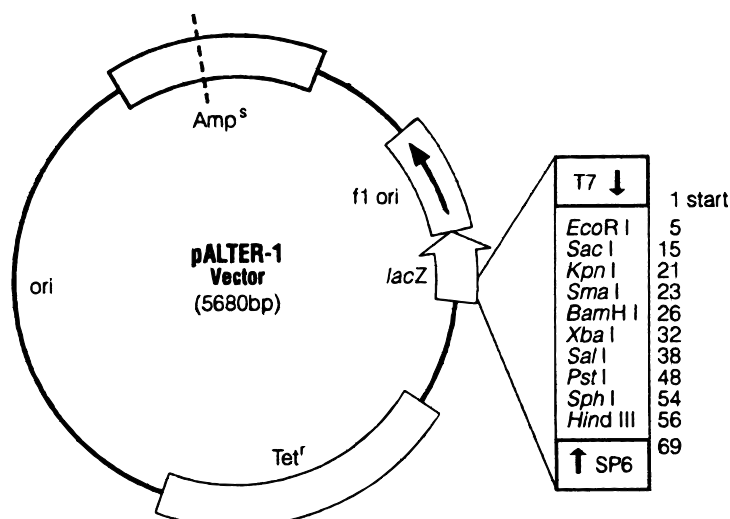


Abb. 2.1: Struktur des Mutagenesevektors pAlter-1

Amp^s = Strukturgen der β-Lactamase, das durch eine Punktmutation inaktiviert wurde. Tet^r = Strukturgen der Tetracyclinresistenz. f1 ori = Replikationsursprung zur Generierung von Einzelstrang-Phagen-DNA. ori = Replikationsursprung. *lacZ* = *lacZ*-Gen. T7 = T7-RNA-Polymerase-Promotor. SP6 = SP6-RNA-Polymerase-Promotor.

2.6.2 Präparation von pAlter-1-Phagemid-Einzelstrang-DNA

500 µl einer dichtbewachsenen Übernachtskultur von pAlter-GRP transformierten *E. coli* JM109-Bakterien in LB-Medium (Tetracyclin 10 µg/ml) wurden in 25 ml LB-Medium (Tetracyclin 10 µg/ml) angeimpft und 30 min bei 37 °C und 220 rpm in einem 250 ml Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden mit 200 µl der R408-Helferphagensuspension infiziert, was einer Multiplizität der Infektion von 10 – 20

entspricht. Die Bakterienkultur wurde für weitere 6 h inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und Bakterienreste erneut durch Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 15 min pelletiert. Die Phagen im Überstand wurden durch Zugabe von 0,25 relatives Volumen der Phagenpräzipitationslösung für 60 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 15 min präzipitiert. Das Phagenpellet wurde in 400 µl TE Puffer (pH 8) resuspendiert und die Phagen durch Zugabe von 400 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1 v/v) unter Vortexen für 1 min lysiert. Die Suspension wurde zur Phasentrennung 5 min bei 12.000 g in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert und die wässrige Phase in ein frisches Eppendorffgefäß überführt. Anschließend wurde die Phagenlösung dreimal mit trisäquilibriertem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 v/v) extrahiert und die Phagen-DNA in der wässrigen Phase nach Zugabe von 200 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1,2 ml Ethanol für 2 h bei -20 °C präzipitiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 5 min in einer Eppendorff-Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl dd Wasser resuspendiert. 2 µl wurden in einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetragen und die Mengen gegen bekannte Mengen von pAlter-1-Plasmid abgeschätzt.

Phagenpräzipitationslösung (pH 7.5):

| | |
|--------|----------------|
| 3,75 M | Ammoniumacetat |
| 20 % | PEG 8000 |

2.6.3 Design der Mutations-Oligonukleotide

Die Sequenz der Mutations-Oligonukleotide wurde nach der cDNA des GRP so ermittelt, daß sie zur synthetisierten pAlter GRP ssDNA komplementär sind. Die Nukleotide wiesen eine Länge von 27 – 33 Basen auf, wobei die veränderte Base bzw. die veränderten Basen in der Mitte lokalisiert wurden. Damit konnte eine hohe Stabilität beim Annealing des Oligonukleotids an die ssDNA erreicht werden.

| Mutation | Sequenz | GRP |
|------------------------|--|---------|
| ¹⁸⁸ Leu→Asp | 5'GGCATCTCTGTGGGAG <u>ACT</u> CTGCGCCCTTTGTG3' | 550-582 |
| ¹⁸⁹ Ser→Arg | 5'ATCTCTGTGGGACTCC <u>GT</u> GCGCCCTTTGTGGCA3' | 553-585 |
| ¹⁹⁰ Ala→Glu | 5'GTGGGACTCTCTG <u>AG</u> CCCTTTGTGGCA3' | 559-585 |
| ¹⁹³ Val→Glu | 5'TCTGCGCCCTTTG <u>AG</u> GCAGGTCAGATG3' | 568-594 |
| ¹⁹⁴ Ala→Asp | 5'TCTGCGCCCTTTGTGG <u>AC</u> GGTCAGATGGACTAC3' | 568-602 |
| ¹⁹⁵ Gly→Arg | 5'CCCTTTGTGGCA <u>CG</u> TCAGATGGACTAC3' | 574-602 |

Tab. 2.3: Mutations-Oligonukleotide

Die Bezugnahme erfolgt auf die kodierende cDNA-Sequenz des Rattenleber Glucokinase-Regulatorproteins, wobei gilt 1 = Startcodon, 2156 = Stopcodon. Die zur Glucokinase-Regulatorprotein cDNA-Sequenz unterschiedlichen Nukleotide sind unterstrichen.

2.6.4 Phosphorylierung der Mutations-Oligonukleotide

Jedes Mutations-Oligonukleotid wurde durch das Enzym Polynucleotidkinase und ATP am 5'-Ende phosphoryliert. Die Reaktion von 125 pmol des Oligonukleotids fand in einem 20 µl Ansatz statt. Es wurden 2 µl T4 Polynucleotidkinase (10 U/µl) und 2 µl ATP (10 mM) in T4 Polynucleotidkinasepuffer verwendet. Nach der Inkubation bei 37 °C für 30 min wurde das Enzym bei 70 °C für 10 min inaktiviert.

10x T4 Polynucleotidkinasepuffer (pH 7,6):

| | |
|--------|-------------------|
| 700 mM | Tris |
| 100 mM | MgCl ₂ |
| 50 mM | DTT |

2.6.5 Annealing-Reaktion und Synthese des mutierten Strangs

Für den Mutationsansatz wurden das *Ampicillin Repair*- und das *Tetracyclin Knockout*-Oligonukleotid im molaren Verhältnis von 5:1 zum *Template* eingesetzt. Für das Mutations-Oligonukleotid betrug das Verhältnis 25:1. In einem 20 µl Ansatz wurden je 0,25 pmol des *Ampicillin Repair*- und des *Tetracyclin Knockout*-Oligonukleotids mit 1,25 pmol des verwendeten Mutations-Oligonukleotids und 100 ng pAlter GRP ssDNA in Annealingpuffer für 5 min bei 75 °C im Thermoblock (*Uno* Thermoblock, Biometra) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 °C pro min auf 45 °C und folgend mit

5 °C auf 22 °C abgekühlt. Die Synthese des Heteroduplex-DNA-Moleküls, bei dem der eine Strang der Wildtyp-Basensequenz entspricht und der andere die Mutation trägt, erfolgte nun durch Zusatz von 10 U T4 DNA Polymerase und 2 U T4 DNA Ligase zum Annealingreaktionsansatz. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 30 µl in Synthesepuffer für 90 min bei 37 °C durchgeführt.

10x Annealingpuffer (pH 7,5):

| | |
|--------|-------------------|
| 200 mM | Tris |
| 100 mM | MgCl ₂ |
| 500 mM | NaCl |

10x Synthesepuffer (pH 7,5):

| | |
|--------|-------|
| 100 mM | Tris |
| 5 mM | dNTPs |
| 10 mM | ATP |
| 20 mM | DTT |

2.6.6 Transformation von *E. coli* ES1301mutS und *E. coli* JM109 Bakterien

Von den Syntheseansätzen wurden je 1,5 µl in 50 µl *E. coli* ES1301mutS Bakterien transformiert und die Bakterien auf ampicillinhaltige (50 µg Ampicillin/ml) Agarplatten ausgestrichen. Dieser Bakterienstamm besitzt kein *Mismatch*-Reperatursystem und eignet sich daher besonders als Wirtszelle zur Replikation der Heteroduplexmoleküle und deren Umwandlung in Homoduplexmoleküle.

***E. coli* ES1301mutS:**

lacZ53, mutS201::Tn5, thyA36, rha-5, metB1, deoC, IN(rrnD-rrnE)

Anschließend wurden Klone isoliert und die daraus erhaltenen Plasmide in *E. coli* JM109 transformiert. Anschließend wurden die Bakterien auf ampicillinhaltige Agarplatten ausgestrichen. 25 von den auftretenden Klonen wurden mit einem sterilen Platindraht zunächst auf tetracyclinhaltige und dann auf ampicillinhaltige Agarplatten übertragen und 12 h bei 37 °C bebrütet. Die Plattenböden waren mit einem Gitternetz versehen, bei dem die Positionen fortlaufend nummeriert waren. Die Nummerierung erlaubte die genaue Zuordnung der von den Agarplatten abgenommenen Klone. Diejenigen Bakterienklone, die

Wachstum auf ampicillinhaltigen Agarplatten, aber nicht auf tetracyclinhaltigen zeigten, wurden durch Sequenzanalyse auf die gesetzte Mutation hin überprüft.

2.7 Expression und Charakterisierung der Proteine

2.7.1 Expression der humanen β -Zell Glucokinase in *E. coli*-M15-Bakterien und Aufreinigung über Ni-NTA Agarose

Die kodierende cDNA-Sequenz der humanen β -Zell Glucokinase wurde am Institut für Klinische Biochemie in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE30 subkloniert und in *E. coli* M15-Bakterien transformiert. Das optimierte regulierbare T5/*lac*-Operator-Element dieses *Qiagen* Systems ermöglicht die induzierte Expression des rekombinanten Proteins durch IPTG. Die Integration einer 6-Histidinsequenz an das N-terminale Ende des Glucokinase-Enzymproteins erlaubt eine Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die freundlicherweise zur Verfügung gestellten *E. coli* M15-pQE30-hIGK-Bakterien wurden nach Herstellerangaben zur Expression der humanen β -Zell Glucokinase verwendet. Die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde ebenfalls nach Herstellerangaben über Ni-NTA-Agarose von *Qiagen* durchgeführt. Die Bindungskapazität der Ni-NTA (*Nickel nitrilotriacetic acid*) kovalent bindenden SepharoseCL-6B beträgt 5 – 10 mg Protein/ml Agarosesuspension. Dabei erfolgte die Elution mit 300 mM Imidazol, das die gebundene His₆-Tag-Glucokinase aus der koordinativen Bindung verdrängt. Das erhaltene Eluat der humanen β -Zell Glucokinase wurde in *Slide-A-Lyzer 10 K Dialysis Cassettes* gegen Sonicationpuffer dialysiert und anschließend der Proteingehalt und die Glucokinase-Enzymaktivität bestimmt. Durch Zusatz von 10 % (v/v) Glycerol wurde das Dialysat stabilisiert und bei -20 °C gelagert.

Sonicationpuffer (pH 8,0):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 50 mM | NaH ₂ PO ₄ |
| 300 mM | NaCl |

2.7.2 Expression des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber, der Fructose-2,6-bisphosphatase und des bifunktionellen Enzyms PFK2 in *E. coli* BL21

Das *Glutathione-s-transferase (GST) Gene Fusion System* von *Pharmacia Biotech* bietet eine durch IPTG induzierte Expression eines GST-Tag-Proteins in *E. coli* Bakterien und die

anschließende Aufreinigung durch Affinitätschromatographie. Die Glutathion-S-Transferase wird dabei als enzymatisch aktives etwa 26 kDa großes Protein exprimiert und durch Glutathion Sepharose 4B gebunden. Die zwischen GST und dem zu exprimierenden Protein eingefügte PreScission Protease Erkennungssequenz ermöglicht die Abtrennung des GST-Tag vom Fusionsprotein.

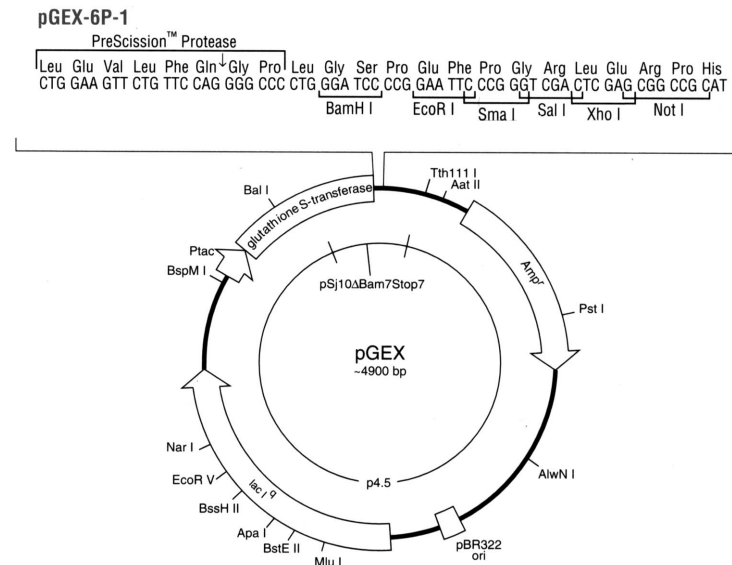


Abb. 2.2: Struktur des Expressionsvektor pGEX-6P-1

Amp^r = Strukturgen der β -Lactamase, *lacI*^q = Repressorgen, P_{tac} = Promotorgen, pBR322ori = Replikationsursprung, glutathione-S-transferase = Sequenz der Glutathion-S-Transferase.

| Oligonukleotidsequenz | |
|-------------------------------------|---|
| <i>forward GRP</i> | 5'GTACAGGATCCATGCCAGGCACCAAACGA3' |
| <i>reverse GRP</i> | 5'GTACAGTCGACTCAATTCAGGGTCCCACAGG3' |
| <i>forward PFK2</i> | 5'GTACAGGATCCATGTCTCGAGAGATGGGAGA3' |
| <i>forward F2,6P₂ase</i> | 5'GTACAGGATCCATGCCTCGATCTATCTACCTATGC3' |
| <i>reverse PFK2</i> | 5'GTACAGTCGACTCAGTAATGGGCAGGTACAG3' |

Tab. 2.4: Primer für die Klonierung in den Vektor pGEX-6P-1

Die unterstrichenen Nukleotide geben den kodierenden Bereich der *Composite*-Primer an. Die kursivgedruckten Nukleotide beschreiben den Erkennungsbereich der Restriktionsendonukleasen.

Die Subklonierung der kodierenden cDNA des GRP, der PFK2 und der F2,6P₂ase in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 erfolgte unter Verwendung der angegebenen PCR Primer und der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sall*. Es wurden 10 µl mit dem entsprechenden Plasmid transformierte *E. coli* BL21-Bakterien aus einem bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstock in 5 ml 2xYTA-Medium über Nacht bei 30 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt.

***E. coli* BL21:**

F⁻, *ompT*, *hsdS* (r_B⁻, m_B⁻), *gal*

Diese Kultur wurde zu 250 ml 2xYTA-Medium gegeben und weitere 2 h bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 inkubiert. Nach der Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 mM erfolgte eine Wachstumsphase der induzierten Bakterien von 4 h bei 30 °C und 220 rpm. Anschließend wurden die Bakterien mit 6000 rpm bei 4 °C für 15 min pelletiert und das Pellet bei -70 °C eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde in 6 ml PBS unter Zusatz von 1 % TritonX aufgenommen und die Bakterien durch Ultraschallbehandlung lysiert. Dabei wurde immer wieder auf Eis inkubiert, um das Lysat vor störenden Wärmeeinflüssen zu schützen. Nach Zentrifugation mit 6000 rpm bei 4 °C für 15 min wurde der Überstand in ein neues Kulturröhrchen überführt.

PBS (pH 7,3):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 140 mM | NaCl |
| 2,7 mM | KCl |
| 10 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 1,8 mM | KH ₂ PO ₄ |

2xYT-Medium:

| | |
|------|---------------------|
| 16 g | Bakto-Tryton |
| 10 g | Bakto-Yeast-Extrakt |
| 5 g | NaCl |

Die Substanzen wurden in 1000 ml dd H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

2xYTA-Medium:

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 2xYT Medium | |
| Ampicillin | Endkonzentration: 100 µg/ml |

2.7.3 Expression des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber und der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase in *S. pombe*

Da in *E. coli* keine Expression von enzymatisch aktivem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber und der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase möglich war, wurde das *ESP Yeast Protein Expression and Purification System* von Stratagene zur Produktion von GST-Tag rekombinantem Protein ausgewählt. Dieses System verwendet die Hefe *Schizosaccharomyces pombe*, in der eine eukaryotische posttranslationale Modifikation des exprimierten Fusionsproteins ermöglicht wird. Die Induktion der Proteinexpression wird durch den Promotor p_{nmt1} (= *no message in thiamine*) reguliert, der bei Konzentrationen von über 0,5 μ M Thiamin vollständig gehemmt wird und in thiaminfreiem Medium aktiviert ist. Die Subklonierung der kodierenden cDNA des GRP und der PFK2 in den Expressionsvektor pESP-1 erfolgte unter Verwendung der angegebenen PCR Primer und der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sma*I.

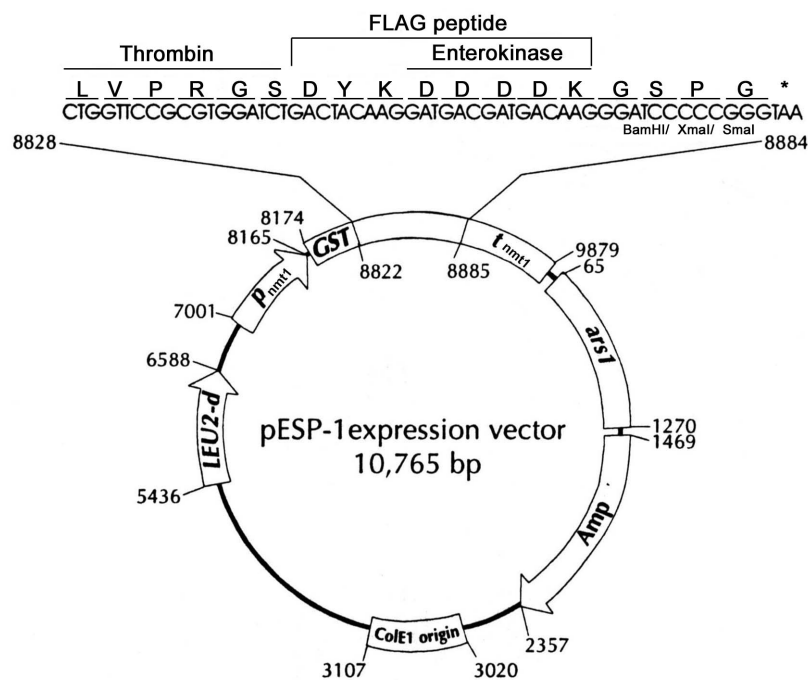


Abb. 2.3: Struktur des Expressionsvektors pESP-1

Amp^r = Strukturgen der β -Lactamase, ColE1 origin = Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli*, *ars1* = Replikationsursprung zur Replikation *S. pombe*, *LEU2-d* = Selektionsmarker in *S. pombe*, p_{nmt1} = Promotorgen, t_{nmt1} = Terminatorgen, GST = Sequenz der Glutathion-S-Transferase.

Dieser Expressionsvektor besitzt keine Erkennungssequenz für die PreScission Protease, die im Gegensatz zur Enterokinase und dem *FLAG-peptide* eine effektive Abtrennung des GST-Tags vom Fusionsprotein erlaubt. So erfolgte zusätzlich eine Subklonierung mit einem *composite forward* primer, der unter Verwendung des Plasmids pGEX-6P-1-GRP als *template* die Amplifikation der PreScission Proteasesequenz am 5' Ende der kodierenden cDNA ermöglichte. Da nur die Restriktionsendonuklease *XmaI* verwendet werden konnte, war eine in der Orientierung der cDNA festgelegte Subklonierung in den Vektor nicht möglich. Positive Klone der Subklonierung mußten unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *PstI* auf ihre Orientierung hin überprüft werden.

| Oligonukleotidsequenz | |
|-----------------------|--|
| <i>forward GRP</i> | 5'GTACAGGATCC <u>ATGCCAGGCACCAAACGA</u> 3' |
| <i>reverse GRP</i> | 5'GTACACCCGGG <u>TCAATTCAGGGTCCCACAGG</u> 3' |
| <i>forward PFK2</i> | 5'GTACAGGATCC <u>ATGTCTCGAGAGATGGGAGA</u> 3' |
| <i>reverse PFK2</i> | 5'GTACACCCGGG <u>TCAGTAATGGGCAGGTACAG</u> 3' |
| <i>forward PS+</i> | 5'GTACACCCGGG <u>CCTAAATCGGATCTGGAAG</u> 3' |

Tab. 2.5: Primer für die Klonierung in den Vektor pESP-1

Die unterstrichenen Nukleotide geben den kodierenden Bereich der *Composite*-Primer an. Die kursivgedruckten Nukleotide beschreiben den Erkennungsbereich der Restriktionsendonukleasen.

5 µg der Plasmide pESP-1-GRP, pESP-1-PS-GRP und pESP-1-PFK2 wurden in 100 µl chemisch kompetente *S. pombe* SP-Q01 von Stratagene transformiert. Der Reaktionsansatz wurde erst 30 min bei 30 °C und dann 15 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden je 20 und 80 µl auf EMM-Thiamin-Agarplatten ausgestrichen und für 4 – 6 Tage bei 30 °C inkubiert. Einzelne der aufgetretenen Klone wurden auf eine neue Agarplatte übertragen und erneut 1 – 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Von diesen Platten wurde eine 1 cm² Fläche an Hefezellen abgenommen, in 1 ml 20 % (v/v) Glycerol gelöst und bei -70 °C eingefroren. Dieser Glycerolstock diente zur Herstellung von Hefezellklonen auf EMM-Thiamin-Agarplatten, die jeweils für eine Woche verwendet werden konnten. 10 ml YES Medium wurden mit einem Hefezellklon versetzt, gut gevortext und über Nacht bei 30 °C und 270 rpm inkubiert. 200 ml frisches YES Medium wurden mit der Vorkultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 versetzt und für weitere 5 h bis zu einer OD_{600nm} von 0,9 geschüttelt. Die

Zellen wurden bei 1000 g für 5 min pelletiert und anschließend zweimal mit dd H₂O gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 400 ml EMM Medium aufgenommen und die Hefezellen für 18 – 20 h bei 30 °C und 270 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und bei -70 °C eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde in 6 ml PBS unter Zusatz von 1 % TritonX aufgenommen, mit 16 g *Glass Beads* versetzt und bei 4 °C 15 min scharf gevortext. Die Aufschlußrate der Hefezellen wurde mikroskopisch überprüft. Nach Zentrifugation mit 12.000 rpm bei 4 °C für 5 min wurde der Überstand in ein neues Kulturröhrchen überführt.

EMM-Medium:

32 g

EMM *powder*

Die Substanzen wurden in 1000 ml dd H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

YES-Medium:

35 g

YES *powder*

Die Substanzen wurden in 1000 ml dd H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

EMM-Thiamin-Agarplatten:

32 g

EMM *powder*

20 g

Agar

Thiamin

Endkonzentration: 25 µM

Die Substanzen wurden in 1000 ml dd H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

Für eine 9 cm Petrischale wurden je 20 ml Agarlösung verwendet. Die Agarplatten wurden bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert.

2.7.4 Aufreinigung des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber, der Fructose-2,6-bisphosphatase und des bifunktionellen Enzyms PFK2 über Glutathion Sepharose 4B

Der aus der Expression der Bakterien erhaltene Überstand wurde mit 500 µl vorequillibrierter Glutathion Sepharose 4B-Suspension versetzt und 1 h bei 4 °C geschüttelt. Die Bindungskapazität dieser Suspension liegt bei etwa 8 mg Glutathion-S-Transferase/ml. Nach Zentrifugation mit 500 g bei 4 °C für 5 min wurde das Pellet dreimal mit PBS gewaschen und anschließend dreimal mit 200 µl Elutionspuffer versetzt, wobei die Eluate jeweils separiert wurden. Die Eluate wurden vereinigt und über *Centricon 10.000 MWCO Centrifugal Filter* aufkonzentriert und gereinigt. Zum gezielten Verdau der GST-

Fusionsproteine wurde entweder das Eluat oder direkt das Pellet mit PreScission Protease weiterbehandelt.

Elutionspuffer (pH 8,0):

| | |
|------------------|-----------------------|
| 10 mM | Glutathion, reduziert |
| 50 mM | Tris |
| Lagerung: -20 °C | |

2.7.5 Gezielter Verdau der GST-Fusionsproteine durch PreScission Protease

Das mit PBS gewaschene Pellet der Glutathion Sepharose 4B wurde einmal mit PreScission Puffer gewaschen. Anschließend wurden 20 µl PreScission Protease in 230 µl PreScission Puffer zugesetzt und 4 h bei 4 °C geschüttelt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde separiert und das Pellet mit 250 µl PreScission Puffer erneut eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und über *Centricon 10.000 MWCO Centrifugal Filter* aufkonzentriert und gereinigt.

PreScission-Puffer (pH 7,0):

| | |
|--------|------|
| 50 mM | Tris |
| 150 mM | NaCl |
| 1 mM | EDTA |
| 1 mM | DTT |

2.7.6 Messung der Enzymaktivität der humanen β -Zell Glucokinase

Die Glucokinase-Enzymaktivität wurde in einem enzymgekoppelten photometrischen Test gemessen. Das bei der Phosphorylierung des Substrats D-Glucose durch die Glucokinase gebildete Glucose-6-phosphat wird durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt. Das durch diese Dehydrogenierung entstehende NADPH wird photometrisch bei 340 nm gemessen. 1000 µl Reaktionsmedium (vorgewärmt auf 37 °C) wurden in einer Einmalküvette mit Glucokinase versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 21 x konzentrierter, in H₂O gelöster Glucose gestartet. Die Endkonzentration der Glucose betrug 100 mM.

| <u>Reaktionsmedium (pH 7,4):</u> | |
|---|----------------------------------|
| 20 mM | Hepes |
| 125 mM | KCl |
| 7,5 mM | MgCl ₂ |
| 5 mM | Na-ATP |
| 0,5 mM | NADP |
| 1 µU/µl | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase |

Nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37 °C wurden die Extinktionsänderungen bei 340 nm über 5 min in einminütigen Abständen registriert. Die gemessenen Extinktionsänderungen wurden nach folgender Formel in die spezifische Enzymaktivität

umgerechnet:

$$V = \frac{\Delta E \cdot V_p}{\epsilon_0 \cdot d \cdot c_p}$$

V : Enzymaktivität (U/mg Protein)

ΔE : Extinktionsänderung (mOD/min)

V_p : Volumen des Reaktionsansatzes (ml)

ϵ_0 : molarer Extinktionskoeffizient (6,23 cm²/µmol für NADPH)

d : Höhe der Flüssigkeitssäule des Reaktionsansatzes (1,0 cm)

c_p : Proteingehalt in der Küvette (mg)

1 Unit der Enzymaktivität wurde definiert als 1 µmol Glucose-6-phosphat, gebildet aus D-Glucose und ATP in 1 min bei 37 °C.

2.7.7 Messung der Enzymaktivität des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber

Die Enzymaktivität des Glucokinase-Regulatorproteins wurde indirekt über die Hemmung der Glucokinaseenzymaktivität in einem enzymgekoppelten photometrischen Test gemessen. Auf das bei der Phosphorylierung des Substrats D-Glucose durch die Glucokinase gebildete ADP wird vom Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase eine Phosphatgruppe übertragen. Das dabei entstandene Pyruvat wird durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Abnahme der NADH wird photometrisch bei 340 nm gemessen. 1000 µl Reaktionsmedium (vorgewärmt auf 37 °C) wurden in einer Einmalküvette mit 5 mM Glucose und dem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber versetzt.

| <u>Reaktionsmedium (pH 7,1):</u> | |
|---|---------------------|
| 25 mM | Hepes |
| 25 mM | KCl |
| 1 mM | MgCl ₂ |
| 1 mM | Na-ATP |
| 0,15 mM | NADH |
| 0,25 mM | Phosphoenolpyruvat |
| 10 µg/ml | Lactatdehydrogenase |
| 10 µg/ml | Pyruvatkinase |

Nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37 °C wurden 15 mU Glucokinase zugesetzt und die Extinktionsänderungen bei 340 nm über 5 min in einminütigen Abständen registriert. Die gemessenen Extinktionsänderungen wurden nach der beschriebenen Formel in die spezifische Enzymaktivität umgerechnet. 1 Unit der Enzymaktivität des Glucokinase-Regulatorproteins wurde definiert als halbmaximale Inhibierung der Glucokinase.

2.7.8 Messung der Enzymaktivität der Fructose-2,6-bisphosphatase und des bifunktionellen Enzyms PFK2

Die Enzymaktivität der Fructose-2,6-bisphosphatase wurde in einem enzymgekoppelten photometrischen Test gemessen. Das bei der Dephosphorylierung des Substrats Fructose-2,6-bisphosphat durch die Fructose-2,6-bisphosphatase gebildete Fructose-6-phosphat wird durch Phosphoglucose-Isomerase zu Glucose-6-phosphat isomerisiert. Glucose-6-phosphat wird dann durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt. Das durch diese Dehydrogenierung entstehende NADPH wird photometrisch bei 340 nm gemessen. 1000 µl Reaktionsmedium (vorgewärmt auf 25 °C) wurden in einer Einmalküvette mit Fructose-2,6-bisphosphatase versetzt.

| <u>Reaktionsmedium (pH 5,7):</u> | |
|---|----------------------------------|
| 100 mM | Tris |
| 0,2 mM | EDTA |
| 100 µM | NADP |
| 0,4 U/ml | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase |
| 1 U/ml | Phosphoglucose-Isomerase |

Es wurden 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 5 μ M Fructose-2,6-bisphosphat zugesetzt und die Extinktionsänderungen bei 340 nm über 10 min in einminütigen Abständen registriert. Die gemessenen Extinktionsänderungen wurden nach der oben beschriebenen Formel in die spezifische Enzymaktivität umgerechnet. Der V_{\max} -Wert wurde durch Auswertung der V gegen S Daten mit der nichtlinearen Regressionsroutine 'Boltzmann Sigmoidale' nach folgender Gleichung ermittelt:

$$V = \frac{V_{\min} + (V_{\max} - V_{\min})}{1 + e^{\frac{V_{50} - S}{\text{slope}}}}$$

- V : Enzymaktivität (U/mg Protein)
V_{min} : Plateau der Sigmoidalen
V_{max} : maximale Enzymaktivität (U/mg Protein)
V₅₀ : Substratkonzentration mit halbmaximaler Enzymaktivität (mM)
S : Substratkonzentration (mM)
slope : 1/Steigung der Sigmoidalen im Wendepunkt (mM)

Die K_m -Werte wurden sowohl aus der o.g. 'Boltzmann Sigmoidalen' durch Extrapolation des $\frac{1}{2}V_{\max}$ -Wertes auf die Abszisse als auch durch lineare Regressionsanalyse der nach Hanes-Woolf (S/V gegen S) transformierten Daten bestimmt.

Die Enzymaktivität der 6-Phosphofructo-2-kinase wurde ebenfalls in einem enzymgekoppelten photometrischen Test gemessen. Fructose-6-phosphat wird durch 6-Phosphofructo-2-kinase zu Fructose-2,6-bisphosphat phosphoryliert. Das gebildete Fructose-2,6-bisphosphat aktiviert die pyrophosphatabhängige Fructose-6-phosphatkinase. Diese katalysiert in Gegenwart von Pyrophosphat die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat. Fructose-1,6-bisphosphat wird durch Aldolase zu Glyceraldehydphosphat und Dihydroxyacetonphosphat gespalten und das Glyceraldehydphosphat durch Triosephosphat-Isomerase ebenfalls zu Dihydroxyacetonphosphat isomerisiert. Das Dihydroxyacetonphosphat wird durch die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase zu Glycerol-3-phosphat reduziert, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Abnahme des NADH wird photometrisch bei 340 nm gemessen. 50 μ l Inkubationsmedium wurden zu 50 μ l 6-Phosphofructo-2-kinase enthaltende Probenlösung gegeben und 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l 0,1 N NaOH-Lösung zugesetzt und für 5 min auf 80 °C erhitzt. Dadurch wurde die 6-Phosphofructo-2-kinase

inaktiviert und das gebildete Fructose-2,6-bisphosphat stabilisiert. Die Probenlösung wurde nun mit Essigsäure neutralisiert und zu 800 µl Reaktionsmedium (vorgewärmt auf 25 °C) in eine Einmalküvette gegeben. Die Extinktionsänderungen bei 340 nm wurden über 10 min in einminütigen Abständen registriert. Anhand einer Eichgeraden von 0,2, 0,5 und 1 pM Fructose-2,6-bisphosphat konnte die in der Probe gebildete Fructose-2,6-bisphosphatasekonzentration bestimmt werden. 1 Unit der 6-Phosphofructo-2-kinase Enzymaktivität wurde definiert als 1 µmol Fructose-2,6-bisphosphat, gebildet in 1 min bei 37 °C.

Inkubationsmedium (pH 7,5):

| | |
|--------|---------------------|
| 100 mM | Tris |
| 0,1 mM | EDTA |
| 10 mM | MgCl ₂ |
| 2 mM | ATP |
| 2 mM | Fructose-6-phosphat |

Reaktionsmedium:

| | |
|-----------|--|
| 50 mM | Tris |
| 2 mM | MgCl ₂ |
| 1 mM | Fructose-6-phosphat |
| 0,15 mM | NADH |
| 10U/l | pyrophosphatabhängige Fructose-6-phosphatkinase |
| 0,45 kU/l | Aldolase |
| 5 kU/l | Triosephosphat-Isomerase |
| 1,7 kU/l | Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase |
| 0,5 mM | Pyrophosphat |

2.7.9 Magnetocapture Bindungsassay mit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads

Die Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* ermöglichen eine Bindung von bis zu 300 µg His₆-Tag-Protein/ml Suspension in aktiver Konformation. Durch Separation der etwa 50 µm kleinen magnetischen Partikel mit Hilfe eines Magneten kann eine effektive Isolation der Proteine ohne stringente Waschbedingungen erreicht werden. So können auch schwache Interaktionspartner der gebundenen His₆-Tag humanen β-Zell Glucokinase isoliert und identifiziert werden. 3 µg His₆-Tag humane β-Zell Glucokinase wurden in 500 µl Bindungspuffer verdünnt und mit 6 µg rekombinantem Protein oder 10 µg BSA als

Kontrollreaktion versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min wurden 10 µl der Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* Suspension zugesetzt und weitere 5 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die *Magnetic Beads* in einem Magnetständer fixiert, der Überstand entnommen und die *Beads* in 500 µl Bindungspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min geschüttelt und die *Beads* dann separiert. Durch Erhitzen bei 95 °C für 2 min wurden die Proteine von den *Beads* gelöst und in der SDS-Page analysiert.

Bindungspuffer (pH 8,0):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 50 mM | NaH ₂ PO ₄ |
| 300 mM | NaCl |
| 20 mM | Imidazol |
| 0,05% | Tween 20 |

2.8 Methoden des „Two Hybrid“ Systems

2.8.1 MATCHMAKER GAL4 *Two Hybrid* System 2 von Clontech

Das *Two Hybrid* System 2 basiert auf dem Hefe GAL4 Protein, welches aus zwei Domänen besteht. Die DNA-Bindungsdomäne bindet spezifisch an die UAS-Aktivierungsregion in Hefen und die Transkription von Reportergenen wird durch die Aktivierungsdomäne aktiviert. Der Vektor pAS2-1 enthält separat die Sequenz für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne unter der Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors. Testproteinsequenzen oder Datenbanken können als C-terminale GAL4-Fusionen in die multiple Klonierungsregion (MCS) eingefügt werden. Die Transkription wird durch das ADH1-Terminationssignal beendet. Der Vektor pACT2 enthält in gleicher Art die Sequenz für die GAL4-Aktivierungsdomäne. Bei der Kointransformation beider Vektoren in Hefen können die exprimierten Domänen alleine nicht miteinander interagieren und die Transkription von Reportergenen wird nicht aktiviert. Erst als Fusionsproteine mit zwei interagierenden Proteinen können die beiden Domänen eine solche sterische Annäherung erreichen, die zur Aktivierung der Transkription der Reportergene führt. Die Detektion einer solchen Proteininteraktion in der Hefezelle stellt die Expression des Reportergens *β-Galactosidase* in den Hefestämmen Y190 und CG1945 und die Expression des Reportergens *HIS3* im Hefestamm CG1945 dar.

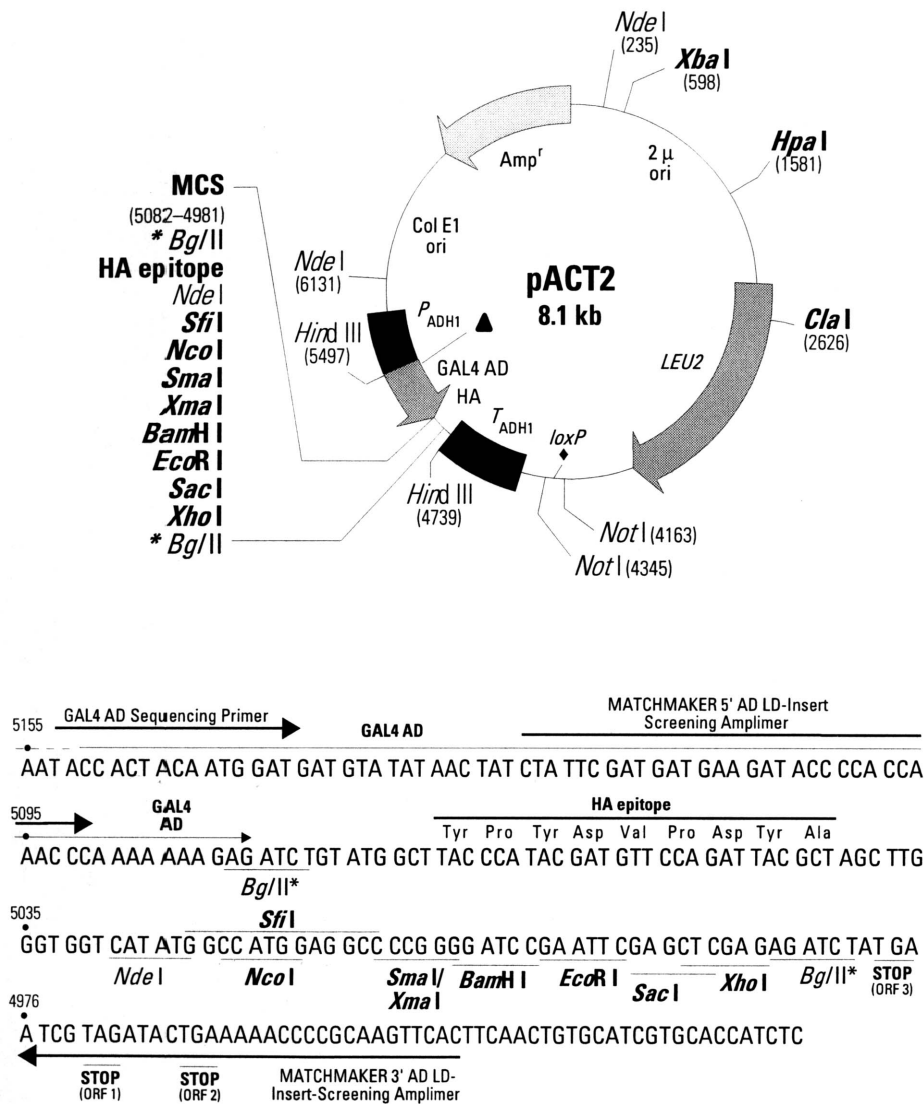


Abb. 2.4: Struktur des Vektors pACT2

Amp^r = Strukturgen der β -Lactamase, ColE1 origin = Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli*, 2 μ origin = Replikationsursprung zur Replikation in *S. cerevisiae*, P_{ADH1} = Promotorgen, T_{ADH1} = Terminatoren, GAL4 AD = GAL4-Aktivierungsdomäne, LEU2 = Selektionsmarker.

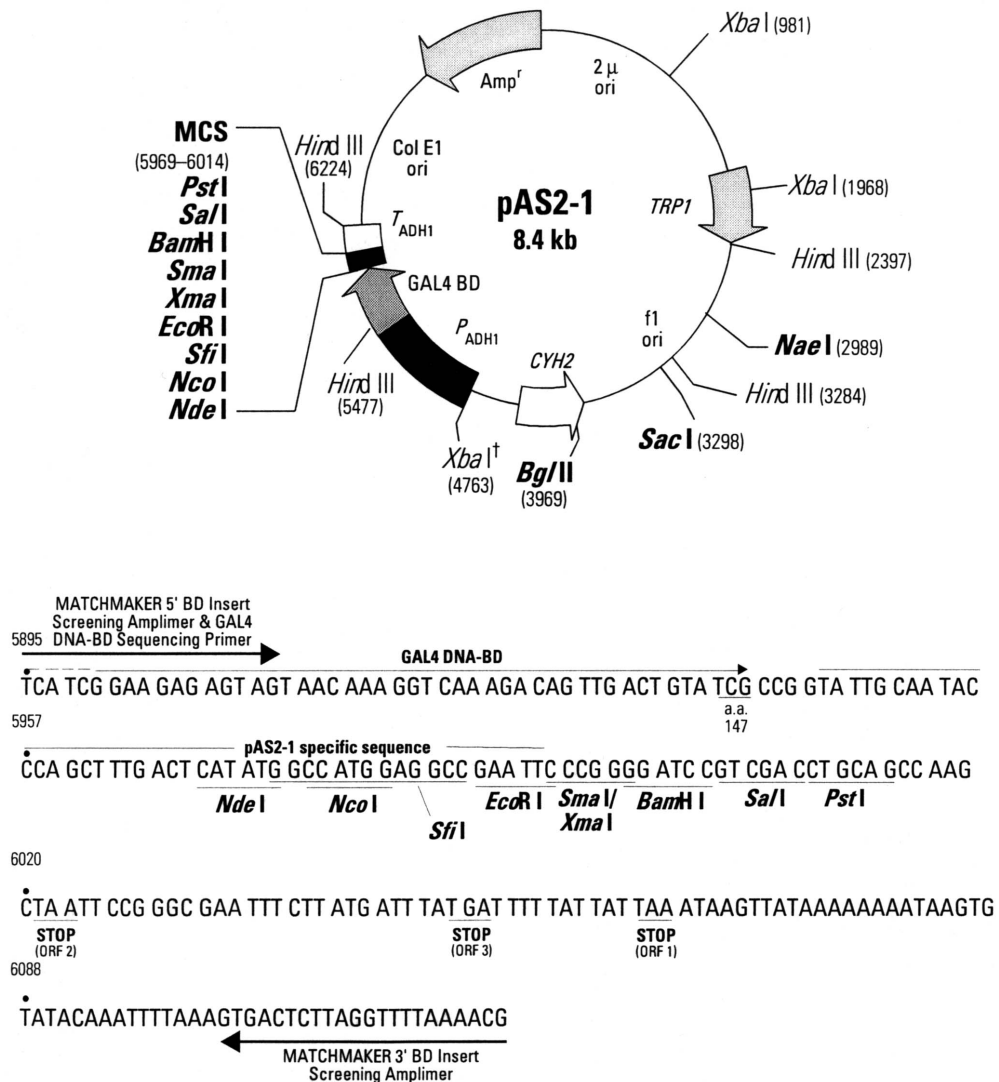


Abb. 2.5: Struktur des Vektors pAS2-1

Amp^r = Strukturgen der β -Lactamase, ColE1 origin = Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli*, 2 μ origin = Replikationsursprung zur Replikation in *S. cerevisiae*, *P*_{ADH1} = Promotorgen, *T*_{ADH1} = Terminatorgen, GAL4 BD = GAL4-DNA-Bindungsdomäne, *CHY2* = Cycloheximidsensitivität, *TRP1* = Selektionsmarker.

Die Subklonierung der kodierenden cDNA der Glucokinase, des Glucokinase-Regulatorproteins, der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase, der Fructose-2,6-bisphosphatase und der 6-Phosphofructo-2-kinase in die Vektoren pAS2-1 und pACT2 erfolgte unter Verwendung der angegebenen PCR Primer und Restriktionsendonukleasen.

| Oligonukleotidsequenz | |
|---|--|
| <i>forward pAS2-1 hIGK</i> | 5'GTACAGTACACATATG <u>GCTGGACGACAGAGCCAGG</u> 3' |
| <i>forward pAS2-1 hLGK</i> | 5'GTACAGTACACATATG <u>CCCAGACCAAGATCCCAA</u> 3' |
| <i>reverse pAS2-1 GK</i> | 5'GTACAGTCGACTC <u>ACTGGCCCCAGCATA</u> CA3' |
| <i>forward pACT2 hIGK</i> | 5'GTACACCATGGAGATGCTGGACGACAGAGCC3' |
| <i>forward pACT2 hLGK</i> | 5'GTACACCATGGAGATG <u>CCCAGACCAAGATCC</u> 3' |
| <i>reverse pACT2 GK</i> | 5'GTACACTCGAGTC <u>ACTGGCCCCAGCATA</u> CA3' |
| <i>forward GRP</i> | 5'GTACACCATGGAGATGCCAGGCACCAAACGA3' |
| <i>reverse GRP</i> | 5'GTACAGAATTCTCAATTCAGGGTCCCACAGG3' |
| <i>forward PFK2/Ki</i> | 5'GTACACCCGGGGATGTCTCGAGAGATGGGAGA3' |
| <i>reverse Ki</i> | 5'GTACAGGATCCAGGTGTGACATGGATGTTCA3' |
| <i>reverse PFK2</i> | 5'GTACAGGATCCTCAGTAATGGGCAGGTACAG3' |
| <i>forward pACT2 F26P₂ase</i> | 5'GTACACCCGGGGATGCCTCGATCTATCTACCTAT3' |
| <i>reverse pACT2 F26P₂ase</i> | 5'GTACAGGATCCTCAGTAATGGGCAGGTACAG3' |
| <i>forward pAS2-1 F26P₂ase</i> | 5'GTACAGAATCCATGCCTCGATCTATCTACCTATGC3' |
| <i>reverse pAS2-1 F26P₂ase</i> | 5'GTACAGTCGACTCAGTAATGGGCAGGTACAG3' |

Tab. 2.6: Primer für die Klonierung in die Vektoren pAS2-1 und pACT2

Die unterstrichenen Nukleotide geben den kodierenden Bereich der *Composite*-Primer an. Die kursivgedruckten Nukleotide beschreiben den Erkennungsbereich der Restriktionsendonukleasen.

| | Restriktionsendonukleasen |
|--|---------------------------|
| <i>pAS2-1 GK</i> | NdeI/Sal |
| <i>pACT2 GK</i> | NcoI/XhoI |
| <i>pAS2-1/pACT2 GRP</i> | NcoI/EcoRI |
| <i>pAS2-1/pACT2 PFK2, pAS2-1/pACT2 Ki, pACT2 F26P₂ase</i> | SmaI/BamHI |
| <i>pAS2-1 F26P₂ase</i> | EcoRI/SalI |

Tab. 2.7: Restriktionsendonukleasen für die Klonierung in die Vektoren pAS2-1 und pACT2

2.8.2 Hefestämme

Die Hefestämme Y190 und CG1945 wurden in YPD Medium mit 50 % (v/v) Glycerol von Clontech geliefert und bei -70 °C gelagert.

Saccharomyces cerevisiae Y190:

MATa, *ura* 3-52, *his* 3-200, *ade* 2-101, *lys* 2-801, *trp* 1-901, *leu* 2-3, 112, *gal4*Δ, *gal80*Δ, *cyh*'2,
 LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-*lacZ*

Saccharomyces cerevisiae CG1945:

MATa, *ura* 3-52, *his* 3-200, *ade* 2-101, *lys* 2-801, *trp* 1-901, *leu* 2-3, 112, *gal4*-542, *gal80*-538, *cyh*'2,
 LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3::GAL417^{-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-*lacZ*

Hefezellen des Stammes Y190 und CG1945 wurden aus einem bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstock mit einer sterilen Impföse auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und 2 Tage bei 30 °C vermehrt. Die aufgetretenen Hefekolonien konnten bei einer Lagerung der Agarplatten bei 4 °C über einen Zeitraum von 3 Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden.

YPD-Agar:

| | |
|------|---------------------|
| 10 g | Bakto-Yeast-Extrakt |
| 20 g | Bakto-Trypton |
| 20 g | Agar |

Die Substanzen wurden in 950 ml dd H₂O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Die flüssige Agarlösung wurde langsam bis auf 55 °C abgekühlt, ehe 50 ml 40%ige sterilfiltrierte Dextrorestammlösung dazugegeben wurden. Für eine 9 cm Petrischale wurden je 35 ml Agarlösung verwendet. Die Agarplatten wurden bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert.

2.8.3 Rat Liver MATCHMAKER cDNA Library von Clontech

Die in *E. coli* BNN132 vorliegende Library besteht aus ca. $3,5 \times 10^6$ verschiedenen Klonen und hat einen Titer von etwa 2×10^8 cfu/ml in LB Medium unter Zusatz von 25 % (v/v) Glycerol. Die mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Eco*RI in den Vektor pACT2 klonierte cDNA der Rattenleber besteht aus Fragmenten zwischen 0,4 und 4 kb. Die Library wurde bei -70 °C gelagert. Nachdem der Titer überprüft wurde, wurden 50 µl der gelieferten Suspension in 10 ml LB Medium aufgenommen und mit einem sterilen Glasspatel auf 100 quadratische 12 cm große ampicillinhaltige (100 µg Ampicillin/ml) LB

Agarplatten ausplattiert. Diese Methode auf Festmedium wurde gewählt, um eine möglichst gleichmäßige Amplifikation aller Klone zu erreichen. Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 31 °C wurde jede Agarplatte mit 25 % (v/v) Glycerol in 5 ml LB Medium überschichtet und die Bakterienklone wurden in das Flüssigmedium überführt. Aus der so erhaltenen hoch konzentrierten Bakteriensuspension wurde die Plasmid-DNA mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert.

2.8.4 Transformation von Hefen

Das Transformationsprotokoll wurde neben dem kleinem Maßstab auch im großem Maßstab für die *Librarytransformation* durchgeführt. Von einer YPD Agarplatte entnommene Hefeklone wurden in 1 ml YPD Medium gelöst und gut gevortext. Die Suspension wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 50 bzw. 150 ml YPD Medium überführt und bei 30 °C mit 270 rpm für 16 – 18 h bis zu einer OD_{600nm} von 1,5 geschüttelt. 300 bzw. 1000 ml frisches YPD Medium wurden mit der Vorkultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 versetzt und für weitere 3 h bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mit 1.000 g für 5 min bei RT pelletiert, in 25 bzw. 500 ml TE Puffer gewaschen und dann in 1,5 bzw. 8 ml TE und LiAc zu gleichen Teilen resuspendiert. Die so erhaltenen Hefezellen besaßen, wenn sie bei 4 °C gelagert wurden, für etwa 1 h eine hohe Transformationskompetenz. In Zellkulturröhrchen wurden 0,1 µg bzw. 1 mg des die Bindungsdomäne kodierenden Plasmids, 0,1 µg bzw. 0,5 mg des die Aktivierungsdomäne tragenden Plasmids und 0,1 bzw. 20 mg *Herring testes carrier DNA* gut gemischt. Anschließend wurden 0,1 bzw. 8 ml der vorbereiteten Hefezellsuspension zugesetzt und gevortext. Der Ansatz wurde dann mit 0,6 bzw. 60 ml PEG/LiAc homogenisiert und bei 30 °C für 30 min mit 200 rpm geschüttelt. Nach Zusatz von 70 µl bzw. 7 ml DMSO wurde die Suspension durch Schwenken des Röhrchens gemischt und für 15 min bei 45 °C mit 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension für 2 min in ein Eisbad gegeben und die Hefezellen wurden dann mit 14.000 rpm bzw. 1.000 g bei RT für 5 sec bzw. 5 min zentrifugiert. Das Hefezellpellet wurde in 0,3 bzw. 10 ml resuspendiert.

YPD-Medium:

| | |
|------|---------------------|
| 10 g | Bakto-Yeast-Extrakt |
|------|---------------------|

| | |
|------|---------------|
| 20 g | Bakto-Trypton |
|------|---------------|

Die Substanzen wurden in 950 ml dd H₂O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt, ehe 50 ml 40%ige sterilfiltrierte Dextrorestammlösung dazugegeben wurden.

10x TE (pH 7,5):

| | |
|-------|------|
| 0,1 M | Tris |
|-------|------|

| | |
|-------|------|
| 10 mM | EDTA |
|-------|------|

Die Lösung wurde autoklaviert.

10x LiAc (pH 7,5):

| | |
|-----|---------------|
| 1 M | Lithiumacetat |
|-----|---------------|

Die Lösung wurde autoklaviert.

PEG/LiAc:

| | |
|------|---------------|
| 8 ml | 50 % PEG 4000 |
|------|---------------|

| | |
|------|--------|
| 1 ml | 10x TE |
|------|--------|

| | |
|------|----------|
| 1 ml | 10x LiAc |
|------|----------|

2.8.5 Amplifikation von transformierten Hefen auf Festmedien

100 µl der bei der Transformation erhaltenen Hefesuspension wurden auf eine 9 cm SD-Agarplatte aufgebracht. Dabei wurden SD-Leu/Trp Agarplatten bei Transformationen in Y190 und CG1945 zur Selektion auf mit den Vektoren pAS2-1 und pACT2 kotransformierten Hefezellen verwendet. Die Wahl von SD-Leu/Trp/His+3-AT Agarplatten ermöglichte bei Transformationen in den Hefestamm CG1945 eine zusätzliche Selektion auf Interaktionen der durch die Vektoren kodierten Fusionsproteine. SD-Leu Agarplatten und SD-Trp Agarplatten wurden zur Kontrolle der Transformationseffizienz der einzelnen Vektoren bei der Kotransformation eingesetzt. Bei der *Librarytransformation* wurde der Ansatz zu je 200 µl auf 50 12 cm große quadratische SD-Leu/Trp/His+3-AT Agarplatten aufgebracht. Die Transformationseffizienz wurde hier durch das Aufbringen von je 100 µl einer 1:1000, 1:100 und 1:10 Verdünnung des Reaktionsansatzes auf SD-Leu/Trp Agarplatten bestimmt. Das Aufbringen der Hefesuspension auf die Agarplatten erfolgte mit Hilfe von Glaskugeln. Etwa zehn der autoklavierten 3 mm kleinen Kugeln wurden pro Agarplatte zugefügt. Durch Bewegen der Schale wurde die Flüssigkeit durch die rollenden Kugeln verteilt, bis sie eingezogen war. Die SD-Agarplatten wurden für etwa vier Tage bis

zum Auftreten von Hefeklonen bei 30 °C inkubiert. SD-Leu/Trp/His+3-AT Agarplatten wurden bis zu zwei Wochen bei 30 °C inkubiert und täglich auf das Auftreten von Hefeklonen kontrolliert. Dabei war die Zeit bis zum Auftreten der Hefeklone ein Hinweis auf die Stärke der Interaktion.

SD-Agar:

| | |
|-------|--|
| 1,7 g | <i>Yeast nitrogen base without amino acids</i> |
| 5 g | Ammoniumsulfat |
| 20 g | Agar |
| x g | Supplement |

Die Substanzen wurden in 950 ml dd H₂O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Die flüssige Agarlösung wurde langsam bis auf 55 °C abgekühlt, ehe 50 ml 40%ige sterilfiltrierte Dextrorestammlösung dazugegeben wurden. Die Agarplatten wurden bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert.

Supplement:

| | |
|------------------------------------|---|
| -Leucin | 0,69 g <i>Dropout Supplement</i> –Leu |
| -Tryptophan | 0,74 g <i>Dropout Supplement</i> –Trp |
| -Leucin/ Tryptophan | 0,64 g <i>Dropout Supplement</i> –Leu/ Trp |
| -Leucin/ Tryptophan/ Histidin | 0,62 g <i>Dropout Supplement</i> –Leu/ Trp/ His |
| + 5mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) | Der auf 55 °C abgekühlten Agarlösung wurden 5 ml 1 M 3-AT-Stammlösung zugesetzt. |

2.8.6 Amplifikation von transformierten Hefen in Flüssigmedium

Ein von einer SD Agarplatte entnommener Hefeklon wurde in 5 ml des entsprechenden SD Mediums gelöst, gut gevortext und für 30 h bei 30 °C mit 270 rpm geschüttelt. 500 µl des Kulturvolumens wurden mit 50 % (v/v) Glycerol versetzt und bei -70 °C als Erhaltungskultur gelagert. 2 ml wurden zur Proteinpräparation verwendet.

SD-Medium:

| | |
|-------|--|
| 1,7 g | <i>Yeast nitrogen base without amino acids</i> |
| 5 g | Ammoniumsulfat |
| x g | Supplement |

Die Substanzen wurden in 950 ml dd H₂O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt, ehe 50 ml 40%ige sterilfiltrierte Dextrorestammlösung dazugegeben wurden.

2.8.7 Qualitativer β -Galaktosidase Filtertest mit X-gal

FrISCHE Hefezellklone von 1 – 3 mm Durchmesser wurden mit einer sterilen Impföse von SD-Agarplatten auf Filterpapier übertragen. Mit entsprechenden Markierungen auf Agarplatte und Filterpapier war es später möglich, positive Klone zuzuordnen. Die Hefezellen wurden durch vollständiges kurzes Eintauchen des Filterpapiers in flüssigen Stickstoff aufgebrochen. Nach kurzem Auftauen wurde das Filterpapier mit der Kolonieseite nach unten in Petrischalen gelegt, in denen sich gleichartige zuvor mit 2 ml X-gal in Z-Puffer getränkte Filterpapiere befanden. Die Petrischalen wurden 8 h bei 30 °C inkubiert. Periodisch wurde dabei das Auftreten von blauen Kolonien geprüft.

Z-Puffer:

| | |
|---------|--|
| 16,1 g | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ |
| 5,5 g | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ |
| 0,75 g | KCl |
| 0,246 g | $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ |

Die Substanzen wurden in 950 ml dd H_2O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

X-gal in Z-Puffer:

| | |
|--------------|--------------------------|
| 1,67 % (v/v) | X-gal Lösung |
| 0,27 % (v/v) | β –Mercaptoethanol |

Die Substanzen wurden in Z-Puffer gelöst.

2.8.8 Proteinpräparation aus Hefen

2 ml einer SD Flüssigmediumkultur wurden mit 14.000 rpm 30 sec zentrifugiert und das Hefezellpellet in 2 ml Z-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefezellen in 100 μl Z-Puffer aufgenommen und 0,3 g *Glass Beads* zugesetzt. Die Aufschlußrate der Hefezellen wurde mikroskopisch überprüft. Bei 4 °C wurde für 10 min scharf gevortext und nach Zentrifugation mit 14.000 rpm für 30 sec der Überstand in ein neues Kulturröhrchen überführt. Aliquots dieser Lösung wurden zur Proteinbestimmung mit der *Bradford*-Methode, zur *Western Blot*-Analyse und zum quantitativen β -Galaktosidase Test verwendet.

2.8.9 Quantitativer β -Galaktosidase Test mit *Galacto Star* Chemilumineszenz Assay (Tropix)

Das *Galacto Star Substrate* wurde 1:50 mit dem *Reaction Buffer Diluent* zum Reaktionspuffer verdünnt. 50 μ l der Probenlösung wurden in einer *LumiStar200* Mikrotiterplatte mit 150 μ l Reaktionspuffer versetzt und 20 min inkubiert. Die Lichtemission wurde anschließend mit dem Luminometer (*Victor², 1420 multilabel counter, Wallac*) in 1 sec Integralen aufgenommen und in RLU (= *Relative Light Units*) aufgezeichnet. Anhand einer Eichgeraden konnten daraus die β -Galactosidase Aktivität und unter Bezugnahme auf die ermittelten Proteinwerte der Proben die spezifische Aktivität in mU/mg Protein bestimmt werden.

2.8.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *E.Z.N.A. Yeast Plasmid DNA Kit* von Peqlab Biotechnologie unter Verwendung von *Lyticase* nach Herstellerangaben.

3 Resultate

Das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase spielt eine entscheidende Rolle für die glucoseinduzierte Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas und die Regulation des Glucosestoffwechsels der Leber. Während in der Leber die Hormone Insulin und Glucagon die Glucokinase hauptsächlich auf der transkriptionellen Ebene regulieren, steht in der β -Zelle des Pankreas die posttranslationale Regulation im Vordergrund. Hierbei wird die Enzymaktivität der Glucokinase durch den Glucosemetabolismus der β -Zelle stimuliert. Ein Regulationsprinzip dieses bislang noch nicht aufgeklärten Mechanismus könnte in der Interaktion des Glucokinaseproteins mit β -Zellstrukturen im Sinne eines Kompartimentierungs- bzw. Translokationsprozesses liegen, der eine Anpassung der Enzymaktivität an die Bedürfnisse der Stimulus-Sekretionskopplung ermöglicht. In der Leber wird die Glucokinase durch ein spezifisches Glucokinase-Regulatorprotein in Abhängigkeit von Fructose-1-phosphat und Fructose-6-phosphat durch kompetitive Hemmung der Enzymaktivität moduliert. Dieses Protein nimmt weiterhin Einfluß auf die für die Leber nachgewiesenen Translokationsprozesse der Glucokinase zwischen Zytoplasma und Nukleus. Das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber konnte jedoch selbst mit sensitiven molekularbiologischen Methoden in den β -Zellen des Pankreas nicht nachgewiesen werden. Selektive Permeabilisierungsstudien konnten auf der anderen Seite eine Kompartimentierung der Glucokinase in insulinsezernierenden Zellen belegen, die durch eine Bindung des Enzyms an bislang unbekannte intrazelluläre Proteinstrukturen verursacht wurde.

3.1 Untersuchungen zu Glucokinase bindenden Proteinen

Durch Immunopräzipitationsuntersuchungen sollten Glucokinase bindende Proteinstrukturen in der insulinproduzierenden RINm5F-Zelllinie charakterisiert werden. Mit Hilfe von Protein-A-Agarose und einem Anti-Rattenleber-Glucokinase-Antikörper konnte sowohl aufgereinigte rekombinante humane β -Zell Glucokinase als auch die Glucokinase aus einem RINm5F-GK-Zellysat immunopräzipitiert werden. Im Coomassie

Blau gefärbten 10%igen SDS-Gel waren allerdings bei beiden Experimenten neben der 58 kDa-Glucokinase-Proteinbande weitere Proteinbanden zu sehen (Daten nicht abgebildet), die den Proteinen des verwendeten Kaninchenserums zugeordnet werden konnten. Durch Überlagerung von Proteinbanden im Experiment mit dem RINm5F-GK-Zellysat war es daher nicht möglich, sicher spezifische Proteinbanden zu identifizieren, die durch Bindung an die Glucokinase koimmunopräzipitierten Proteinen zuzuordnen waren.

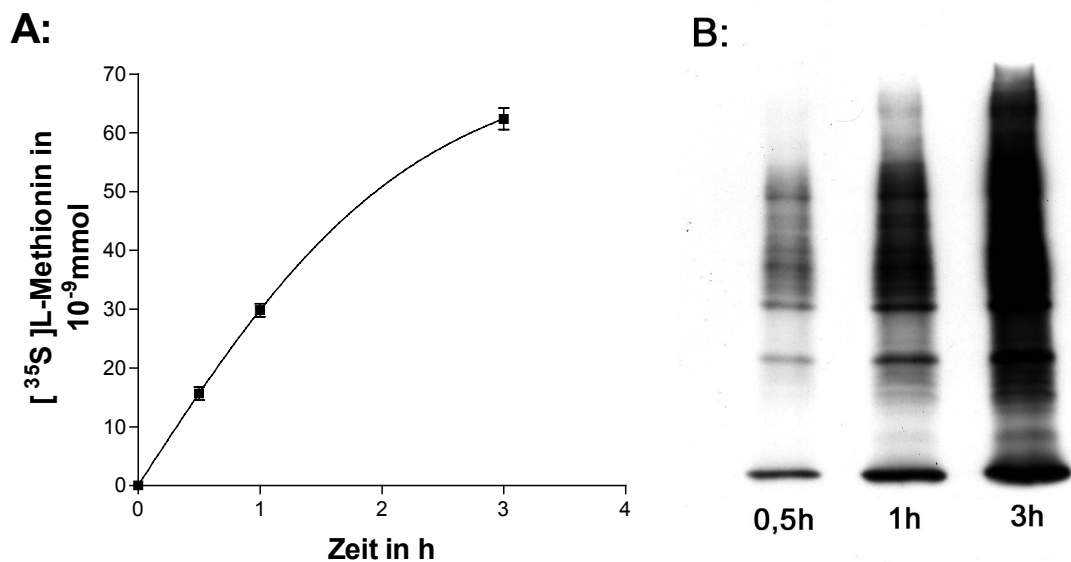


Abb. 3.1: Einbau von [³⁵S] L-Methionin in RINm5F-GK-Zellen bei verschiedenen Inkubationszeiten mit Trans ³⁵S-LABEL (ICN)

Je 150.000 Zellen RINm5F-GK wurden für 24 h inkubiert und anschließend mit Trans³⁵S (ICN) für 0,5 h, 1 h oder 3 h gelabelt. **A:** 1 µl der nach Zellyse und Acetonfällung erhaltenen Proteinlösung wurden zu 5 ml Flüssigszintillator in ein Zählröhrchen pipettiert und die cpm im β-Szintillationszähler bestimmt. Daraus wurde die Menge des eingebauten [³⁵S] L-Methionins quantifiziert, wobei die eingesetzte Inkubationslösung als Standard verwendet wurde. ■ = Mittelwerte ± SEM aus einer Dreifachbestimmung. **B:** 9 µl der Lösung wurden in der SDS-Page aufgetrennt, durch *Semidry Blotting* auf eine PVDF-Membran transferiert und auf einem Kodak Bio Max Autoradiographiefilm dokumentiert. Die Entwicklungszeit des Films betrug 15 h.

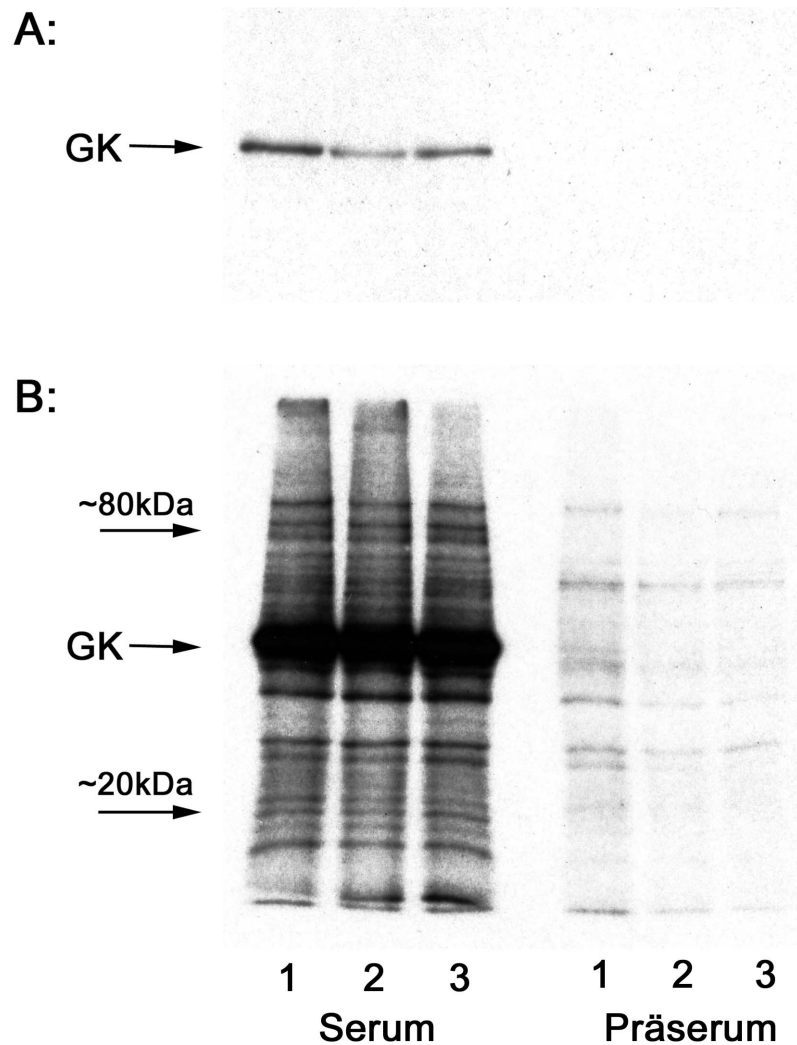


Abb. 3.2: Immunopräzipitation der Glucokinase aus einem [35 S]-gelabelten RINm5F-GK-Zellysate mit Anti-Rattenleber-Glucokinase-Antikörper

Jeweils 600.000 Zellen RINm5F-GK wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h mit Trans 35 S (ICN) gelabelt und anschließend lysiert. Das Lysat wurde unter Verwendung von Protein-A-Agarose immunopräzipitiert. **Serum** = RINm5F-GK-Zellysate präzipitiert mit Anti-Rattenleber-Glucokinase-Antikörper haltigem Kaninchenserum, **Präserum** = RINm5F-GK-Zellysate präzipitiert mit dem vor der Immunisierung des Kaninchens entnommenen Serum, **1**: niedrigstringente Waschbedingungen, **2**: stringente Waschbedingungen, **3**: hochstringente Waschbedingungen während der Präzipitation. Das erhaltene Pellet wurde in 20 μ l SDS Loadingpuffer aufgenommen, wovon 10 μ l in der SDS-Page aufgetrennt und durch *Semidry Blotting* auf eine PVDF-Membran transferiert wurden. **A**: Entwicklungszeit des Kodak Bio Max Autoradiographiefilms von 12 h, **B**: Entwicklungszeit des Kodak Bio Max Autoradiographiefilms von sechs Tagen.

Um Störungen durch Proteine des GK-Antiserums auszuschließen, wurden RINm5F-Zellproteine mit [^{35}S] L-Methionin radioaktiv markiert. In Markierungsversuchen mit Trans ^{35}S -Label (Abbildung 3.1) konnte gezeigt werden, daß eine einstündige Inkubation für den Einbau von [^{35}S] L-Methionin in Proteinstrukturen der RINm5F-GK-Zellen ausreichend ist. Dabei ist es wichtig, in einer Vorinkubation das Komplettmedium gegen methioninfreies Medium auszutauschen, um einen effizienten Einbau des radioaktiv markierten L-Methionins in die gebildeten Proteine zu erreichen. Die Folgeinkubation in Komplettmedium ermöglicht die Komplettierung der während der Inkubation gebildeten Proteine.

Aus einem [^{35}S] L-Methionin gelabelten RINm5F-GK-Zellysat konnte die Glucokinase nun nicht nur immunopräzipitiert, sondern nach SDS-Page und *Semidry Blotting* auch selektiv autoradiographisch detektiert werden. Dabei wurde der Film (Abbildung 3.2 A) zwölf Stunden entwickelt. Nach sechs Tagen Entwicklungszeit (Abbildung 3.2 B) wurden weitere Proteinbanden sichtbar. Auch im mit Präserum durchgeführten Kontrollexperiment wurden Banden detektiert, die im mit hochstringenten Waschbedingungen durchgeführten Ansatz (3) deutlich schwächer zu sehen waren als im Ansatz mit niedrigstringenten Bedingungen (1). Da diese Banden Proteinen zuzuordnen sind, die unspezifisch an Protein-A-Agarose binden, mußten Banden mit einem vergleichbaren Molekulargewicht im Experiment mit antikörperhaltigem Serum ebenfalls als unspezifische Bindungspartner angenommen werden. Eine Proteinbande bei ca. 20 kDa und eine Proteindoppelbande bei etwa 80 kDa war jedoch ausschließlich durch Präzipitation mit antikörperhaltigem Serum zu identifizieren. Beide sind bei hochstringenten Waschbedingungen (Abbildung 3.2, Bahn 3) genauso intensiv wie bei niedrigstringenten Bedingungen (Abbildung 3.2, Bahn 1), so daß es sich wahrscheinlich um durch Bindung an die Glucokinase koimmunopräzipitierte Proteine handelt. Keines der beiden Proteinfragmente entspricht in RINm5F-Zellen dem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber, welches elektrophoretisch als 68 kDa Bande imponieren würde. Durch die Immunopräzipitation radioaktiv markierter RINm5F-Zellproteine konnte somit gezeigt werden, daß in insulinproduzierenden Zellen die Glucokinase spezifisch mit Proteinen interagiert. Die Methode der Koimmunopräzipitation läßt jedoch keine Identifizierung bzw. Charakterisierung der Glucokinase bindenden Proteine zu. Eine systematische Analyse von Glucokinase Interaktionspartnern wurde deshalb mit Hilfe des *Phage Display* Systems durchgeführt.

3.2 Identifizierung von Glucokinase bindenden Peptiden mit Hilfe des „Phage Display“ Systems

Zur Identifizierung der Glucokinase Bindungsproteine wurde das *Phage Display* Verfahren unter Verwendung der Ph.D.-12TM Bibliothek von New England Biolabs gewählt. Diese Library besteht aus linearen Dodekapeptiden und besitzt eine Komplexität von ca. $1,9 \times 10^9$ verschiedenen Peptidsequenzen. Diese variablen Peptidsequenzen sind auf der Phagenoberfläche präsentiert und in der Lage, mit der rekombinanten Glucokinase, die an eine feste Oberfläche fixiert ist, eine Bindung einzugehen. Spezifische Bindungsmotive werden durch ein Panning (von *pan* für Gold), das sind Waschschriffe steigender Stringenz (als Waschschriffe der Goldgräber), selektioniert. Mit diesem Verfahren besteht beim Einsatz von 4×10^{10} Phagen zum 1. Panning eine extrem hohe Wahrscheinlichkeit, daß jede bei zwölf Peptiden mögliche Aminosäurekombination bis zu zwanzigmal durch Phagen präsentiert wird und Glucokinase bindende Motive selektioniert werden können. Eine Library aus linearen Dodekapeptiden ermöglicht dabei im Vergleich zu zyklischen Heptapeptidbibliotheken sowohl die Selektion von vollständigen Bindungspeptidmotiven der Glucokinase als auch von diskontinuierlichen oder konformationsabhängigen Bindungspeptiden.

3.2.1 Isolierung von Glucokinase Bindungspeptiden durch Panning

Um die Glucokinase ohne Funktionsverlust an eine feste Oberfläche zu binden, wurde eine Immobilisierung von rekombinanter humaner β -Zell His₆-Tag-Glucokinase an Ni-NTA-HisSorb-Strips durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die fixierte Glucokinase nach zehn Waschschriffen, die denen eines Panningexperiments vergleichbar waren, weiterhin katalytisch aktiv war. Um zu überprüfen, ob die Glucokinase gleichmäßig in den Wells der Ni-NTA-HisSorb-Strips präsentiert wird, wurden mehrere Strips über Nacht mit einem Überschuß an Protein inkubiert. Der anschließend durchgeführte ELISA mit Anti-Rattenleber-Glucokinase Antikörper vom Kaninchen zeigte eine hohe Antigenbindung ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Wells. Bei direkter elektrostatischer Fixierung an MaxiSorb Mikrotiterplatten (Nunc) konnte im Vergleich zu den Ni-NTA-HisSorb-Strips mit Hilfe des ELISA nur eine 40 % niedrigere Glucokinasebindung detektiert werden. Um eine unspezifische Anreicherung von Phagen an den Ni-Spacer-Komplex auszuschließen, wurde ein Kontrollpanning (Panning K) mit einem nur durch

BSA behandelten Ni-NTA-*HisSorb-Strip* durchgeführt. Von den bindenden Phagen wurden nach dem 1. Panning 20 zur Amplifikation verwendet und die Phagen-DNA isoliert. Durch Sequenzanalyse wurden die Dodekapeptide identifiziert, wobei zwei Klone kein Insert enthielten. Die Peptidsequenzen der 18 Klone sind in Tabelle 3.1 angegeben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1 | H | F | Q | N | T | I | S | S | L | Y | T | T |
| 1 | S | V | G | S | I | P | R | S | V | S | S | S |
| 1 | Q | P | S | P | S | H | G | Q | E | W | R | T |
| 1 | Y | T | L | T | E | P | E | P | S | P | A | R |
| 1 | A | N | T | A | L | W | R | S | G | I | P | F |
| 1 | F | Q | Q | P | Q | W | L | D | T | P | Y | Q |
| 1 | S | M | H | A | T | G | S | H | S | T | L | K |
| 1 | T | M | I | P | G | A | D | T | T | S | G | W |
| 1 | F | T | V | A | Q | P | M | A | F | S | A | L |
| 1 | T | Q | M | T | I | P | T | R | T | V | H | Q |
| 1 | W | P | H | S | A | W | W | M | V | P | R | G |
| 1 | Q | Q | T | D | S | A | L | P | L | P | F | L |
| 1 | A | L | M | H | M | S | S | T | S | R | P | Y |
| 1 | F | F | P | D | T | Q | F | K | F | V | R | V |
| 1 | K | L | H | R | L | P | N | E | L | V | R | P |
| 1 | S | S | Y | L | L | L | E | P | P | A | M | P |
| 1 | Q | E | W | S | P | L | L | S | T | Q | L | S |
| 1 | H | A | N | F | P | T | L | E | A | L | D | V |

Tab. 3.1: Peptidsequenzen der 18 sequenzierten Phagenklone im Kontrollpanning mit BSA (Panning K)

Die Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren entspricht dem Verteilungsmuster der Ph.D.-12TM Bibliothek von New England Biolabs.

Eine Anreicherung von Bindungsmotiven war nicht feststellbar und auch die biochemische Diversität, das heißt, die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Aminosäuren in den isolierten

Peptiden, entsprach der der Ph.D.-12TM Bibliothek. Die Häufigkeit der Aminosäure Histidin lag mit 4,1 % in den 18 Klonen unter der der Bibliothek mit 5,1 %. Histidinrepetitionen traten nicht auf. Somit konnte eine unspezifische Bindung an den Ni-Spacer-Komplex während der Panningexperimente ausgeschlossen werden.

Die Bedingungen für die durchgeführten Panningexperimente sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Beim Panning A wurde durch eine niedrige Tween 20 Konzentration im Waschpuffer die Bindung von schwachen Interaktionspeptiden ermöglicht. Zur Selektion möglichst hochaffiner Phagen wurden die Waschbedingungen in den einzelnen Schritten des Panning B durch Variation der Tween 20 Konzentration verschärft. Im Panning GK wurde zusätzlich die pH-Elution durch Elution mit GK-Protein nach dem Prinzip der Konkurrenz ersetzt und so die Stringenz weiter erhöht.

| | | | |
|-------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------|
| Panning K | Kontrollpanning mit BSA | Niedrige Stringenz der Waschschriffe (0,1% Tween 20) | Elution mit Glycin (pH 2,2) |
| Panning A | 4 sequentielle Panningschritte mit GK | Konstant niedrige Stringenz der Waschschriffe (0,1% Tween 20) | Elution mit Glycin (pH 2,2) |
| Panning B | 4 sequentielle Panningschritte mit GK | Steigende Stringenz der Waschschriffe (0,1 – 0,5 % Tween 20) | Elution mit Glycin (pH 2,2) |
| Panning GK | 3 sequentielle Panningschritte mit GK | Steigende Stringenz der Waschschriffe (0,1 – 0,5 % Tween 20) | Elution mit GK-Protein (pH 7,5) |

Tab. 3.2: Charakterisierung der Bedingungen im Panning K, A, B und GK zur Isolierung von Glucokinase Bindungspeptiden

Zwischen dem 2., 3. und 4. Panning konnte ein Anstieg des Phagentiter in pfu (*plaque forming units*) in den Panningexperimenten ermittelt werden (Tabelle 3.3).

| | | Panning A | Panning B | Panning GK |
|--|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Phagentiter in pfu: | 2. Panning | 1×10^2 | 5×10^2 | 3×10^3 |
| | 3. Panning | 1×10^3 | 1×10^3 | 1×10^4 |
| | 4. Panning | 8×10^3 | 1×10^4 | - |
| Sequenzierte Klone: | 2. Panning | 16 | 13 | 64 |
| | 3. Panning | 36 | 71 | 23 |
| | 4. Panning | 25 | 23 | - |
| Unterschiedliche Peptidsequenzen: | 2. Panning | 16 | 10 | 2 |
| | 3. Panning | 4 | 4 | 2 |
| | 4. Panning | 1 | 2 | - |

Tab. 3.3: Charakterisierung der Anreicherung von Glucokinase bindenden Phagen im Panning A, B und GK

Die Anzahl der unterschiedlichen Peptidsequenzen bezogen auf die sequenzierten Klone zeigte eine Anreicherung von Phagen in den Panning-Selektionsschritten (Tabelle 3.3). Dabei konnten schon ab dem 2. Panning Konsensussequenzen in den Glucokinase Bindungspeptiden nachgewiesen werden. Die Peptidsequenzen der sequenzierten Phagenklone sind in den Tabellen 3.4 – 3.11 dargestellt. Motive der Konsensussequenzen konnten in drei Gruppen eingeteilt werden, die der Übersicht wegen in (1) **blau**, (2) **rot** und (3) **grün** hervorgehoben sind. In Abbildung 3.3 und 3.4 ist die Sequenzanalyse des peptidkodierenden Abschnitts der isolierten Phagen-Einzelstrang-DNA von zwei konsensussequenztragenden Phagenklonen exemplarisch dargestellt.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1 | Q | H | P | T | S | I | F | R | V | D | A | R |
| 1 | N | P | Q | Y | H | N | H | E | W | T | P | S |
| 1 | T | Y | R | Q | H | S | H | G | S | V | L | F |
| 1 | K | P | W | T | V | L | P | A | L | T | Q | T |
| 1 | T | A | L | K | E | P | G | G | S | S | P | P |
| 1 | W | N | L | E | V | V | S | A | P | S | Q | L |
| 1 | F | L | P | K | N | E | F | A | Q | P | M | F |
| 1 | S | P | G | Y | F | Q | P | V | P | P | V | S |
| 1 | A | P | Y | P | T | P | Y | W | T | V | E | V |
| 1 | H | S | L | P | L | L | N | T | H | D | I | Q |
| 1 | S | L | S | T | A | Q | C | K | L | N | D | L |
| 1 | T | M | D | P | R | S | T | W | M | R | I | P |
| 1 | T | L | T | D | L | Q | I | P | A | I | A | S |
| 1 | V | T | K | N | R | F | C | C | W | V | R | E |
| 1 | S | D | S | V | P | Y | V | A | Q | R | K | L |
| 1 | K | A | S | I | L | Y | P | T | F | P | T | L |

Tab. 3.4: Peptidsequenzen der 16 sequenzierten Phagenklone im 2. Panning des Panning A

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 17 | A | H | R | H | P | I | S | F | L | S | T | L |
| 10 | H | G | M | K | V | W | T | L | P | A | T | S |
| 5 | E | Y | L | S | A | I | V | A | G | P | W | P |
| 2 | T | Q | P | S | L | K | C | C | H | A | L | P |
| 1 | K | V | W | T | V | N | P | V | W | P | P | G |
| 1 | S | S | P | G | K | L | W | F | I | P | P | R |

Tab. 3.5: Peptidsequenzen der 36 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des Panning A

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 25 | E | Y | L | S | A | I | V | A | G | P | W | P |

Tab. 3.6: Peptidsequenzen der 25 sequenzierten Phagenklone im 4. Panning des Panning A

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1 | T | P | P | P | A | P | L | A | C | S | A | C |
| 1 | T | Q | M | S | A | P | D | M | Y | P | H | M |
| 1 | Q | L | P | V | R | Q | R | P | P | P | E | L |
| 1 | Y | L | G | Q | H | N | I | R | H | S | M | R |
| 2 | G | L | K | I | W | S | L | P | P | H | H | G |
| 1 | Y | A | L | D | Q | T | S | S | P | S | P | V |
| 4 | A | H | R | H | P | I | S | F | L | S | T | L |
| 1 | G | S | T | Q | A | W | M | S | P | P | L | A |
| 1 | H | P | A | I | Y | P | P | R | S | H | P | A |

Tab. 3.7: Peptidsequenzen der 13 sequenzierten Phagenklone im 2. Panning des Panning B

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 49 | A | H | R | H | P | I | S | F | L | S | T | L |
| 20 | E | Y | L | S | A | I | V | A | G | P | W | P |
| 1 | G | L | K | I | W | R | L | P | P | H | H | G |
| 1 | Q | Q | H | T | D | T | W | S | P | L | S | P |

Tab. 3.8: Peptidsequenzen der 71 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des Panning B

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 21 | A | H | R | H | P | I | S | F | L | S | T | L |
| 2 | E | Y | L | S | A | I | V | A | G | P | W | P |

Tab. 3.9: Peptidsequenzen der 23 sequenzierten Phagenklone im 4. Panning des Panning B

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 24 | A | H | R | H | P | I | S | F | L | S | T | L |
| 40 | E | Y | L | S | A | I | V | A | G | P | W | P |

Tab. 3.10: Peptidsequenzen der 64 sequenzierten Phagenklone im 2. Panning des Panning GK

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 16 | A | H | R | H | P | I | S | F | L | S | T | L |
| 7 | E | Y | L | S | A | I | V | A | G | P | W | P |

Tab. 3.11: Peptidsequenzen der 23 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des Panning GK

Die drei Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind farbig markiert. Zur Übersicht sind Motive der einzelnen Konsensussequenzen in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

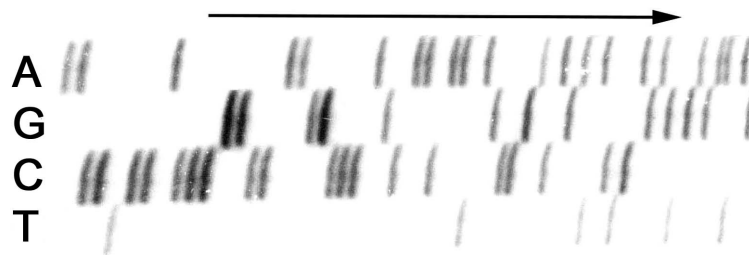


Abb. 3.3: Sequenzanalyse des peptidkodierenden Abschnitts der isolierten Phagen-Einzelstrang-DNA

Die Sequenzanalyse wurde mittels der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Der Pfeil kennzeichnet den peptidkodierenden Abschnitt und zeigt die 5'-3' Leserichtung an. Die Basensequenz CGG-CCA-AGG-CCC-AGC-AAC-AAT-AGC-CGA-CAG-ATA-CTC ist revers komplementär zu translatieren und kodiert für die Peptidsequenz **E-Y-L-S-A-I-V-A-G-P-W-P**.

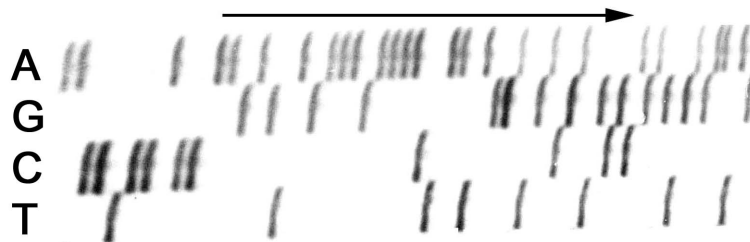


Abb. 3.4: Sequenzanalyse des peptidkodierenden Abschnitts der isolierten Phagen-Einzelstrang-DNA

Die Sequenzanalyse wurde mittels der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Der Pfeil kennzeichnet den peptidkodierenden Abschnitt und zeigt die 5'-3' Leserichtung an. Die Basensequenz AAG-AGT-AGA-AAG-AAA-ACT-AAT-AGG-ATG-ACG-ATG-CGC ist revers komplementär zu translatieren und kodiert für die Peptidsequenz **A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L**.

In allen drei Panningexperimenten konnten somit Glucokinase Bindungsphagen selektiert werden. Dabei zeigte sich im Panning GK bereits im 2. Panning eine komplette Anreicherung zweier Bindungspeptide, so daß auf ein 4. Panning verzichtet werden konnte. Aus allen Experimenten konnten die folgenden drei Konsensussequenzen identifiziert werden. Die Anzahl der sequenzierten Klone ist in Klammern angegeben. Für die 3. Sequenz ist exemplarisch die Verteilung der Konsensusamino-säuren in den Dodeka-peptiden dargestellt (Tabelle 3.12).

| | | |
|----|--------------------------------|-------|
| 1. | A H R H P I S F L S T L | (133) |
| 2. | E Y L S A I V A G P W P | (102) |
| 3. | S L K V W T | (25) |
| | H G M K V W T L P A T S | (10) |
| | L K I W R L P P H H G | (3) |
| | T Q P S L K C C H A L P | (2) |
| | K V W T V N P V W P P G | (1) |
| | S S P G K L W F I P P R | (1) |
| | N P Q Y H N H E W T P S | (1) |
| | K P W T V L P A L T Q T | (1) |
| | T A L K E P G G S S P P | (1) |
| | W N L E V V S A P S Q L | (1) |
| | A P Y P T P Y W T V E V | (1) |
| | H S L P L L N T H D I Q | (1) |
| | S L S T A Q C K L N D L | (1) |
| | Q L P V R Q R P P P E L | (1) |

Tab. 3.12: Konsensussequenzen aus dem Panning A, B und GK

Die drei verschiedenen Konsensussequenzen der Glucokinase Bindungspeptide sind in (1) blau, (2) rot und (3) grün hervorgehoben.

Die Konsensussequenzen der Glucokinase bindenden Peptide wurden im Folgenden durch Recherchen in Proteindatenbanken auf Homologien zu bekannten Proteinen hin untersucht. Zudem wurde die Spezifität der Bindung durch einen quantitativen ELISA charakterisiert.

3.2.2 Charakterisierung der Glucokinase Bindungspeptide

Die Sequenzen der Konsensuspeptide wurden mit Hilfe von Standardsuchroutinen des EBI (*European Bioinformatics Institute*) und EMBL (*European Molecular Biology Laboratory - Protein & Peptide Group*) auf Homologien zu in den Datenbanken *Swall*, *Swissprot* und *Trembl* erfaßten Proteinen hin untersucht. Für die Konsensuspeptidsequenz (3.) X-**S-L-K-V-W-T**-X konnte eine Homologie zu der Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne des bifunktionellen Enzyms 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (PFK2)

gefunden werden (Tabelle 3.13). Die PFK2 nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels ein.

| <i>Database Accession No.</i> | <i>Protein Name</i> |
|-------------------------------|--|
| <i>swissprot:P07953</i> | F261_RAT 6PF-2-K/FRU-2,6-P2ASE |
| <i>swissprot:P16119</i> | F262_RAT 6PF-2-K/FRU-2,6-P2ASE |
| <i>swissprot:P16118</i> | F26L_HUMAN 6PF-2-K/FRU-2,6-P2ASE |
| <i>sptremblnew:AAA4062</i> | AAA40624 RAT 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/ FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE |
| <i>tremblnew:J04197</i> | RN6P2KBI_1 product: "6-phosphofructo-2- kinase/fructose-2,6-bisphosphatase" |
| <i>trembl:M19938</i> | HSF2K6BP_1 Human fructose-6-phosphate,2- kinase:fructose-2,6-bisphosphatase |
| <i>trembl:X52638</i> | HSPKFB_1 Human mRNA for 6-phosphofructo-2- kinase/fructose-2,6-bisphosphatase |
| <i>trembl:Y00702</i> | RNPFKFBP_1 Rat mRNA for 6-phosphofructo-2- kinase/fructose-2,6-bisphosphatase |
| <i>pir:S77704</i> | S77704 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6- bisphosphate 2-phosphatase |

**Tab. 3.13: Ergebnisse der Datenbankanalysen auf die Konsensuspeptidsequenz
S-L-K-V-W-T**

Die Lage der an die Glucokinase bindenden Aminosäuren 298 – 303 in der Fructose-2,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.46) ist in dem kristallographischen Modell (Lee *et al.* 1996) des Enzyms dargestellt (Abbildung 3.5).

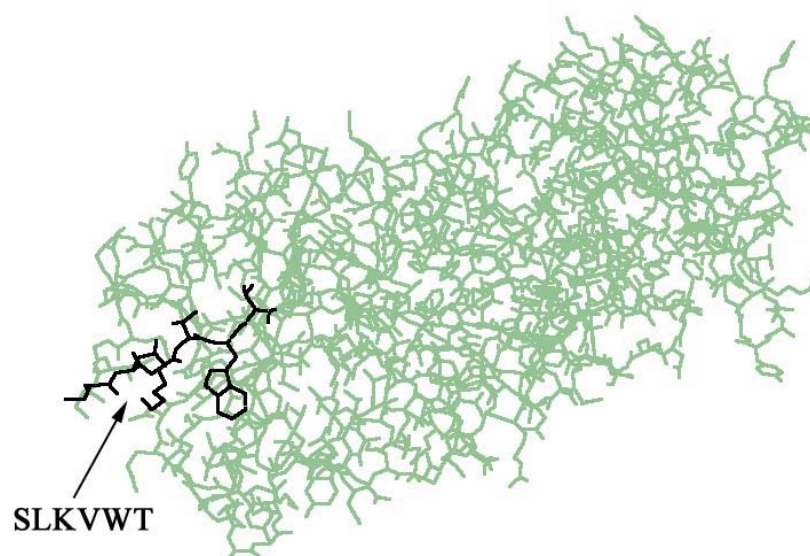


Abb. 3.5: Die Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne des bifunktionellen Rattenleber-Enzyms PFK2

Die Modellansicht basiert auf der Kristallstruktur der Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne (251 – 440) der Rattenleber PFK2 (1 – 470) (Lee *et al.* 1996). Die Abbildung wurde mit dem Programm *Swiss PDB Viewer* erstellt.

Der gesamten Konsensuspeptidsequenz (2.) **E-Y-L-S-A-I-V-A-G-P-W-P** konnte mit den Standardsuchroutinen kein homologes Protein zugeordnet werden. Da ein Bindungsmotiv nur selten aus zwölf Aminosäuren besteht, sondern zumeist erheblich kürzer ist (3 – 6 Aminosäuren), wurde die Datenbankanalyse auf Teilhomologien ausgeweitet. So entsprach die Teilsequenz **X-L-S-A-X-V-A-G-X** einer Region des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber, welches ein bekannter Interaktionspartner der Glucokinase ist (Tabelle 3.14).

| Database Accession No. | Protein Name |
|------------------------|---|
| <i>swissnew:Q14397</i> | GCKR_HUMAN GLUCOKINASE REGULATORY PROTEIN |
| <i>swissnew:Q07071</i> | GCKR_RAT GLUCOKINASE REGULATORY PROTEIN |
| <i>trembl:X68497</i> | RNGLRE_1 product:”glucokinase regulator” |
| <i>pir:S41745</i> | S41745 glucokinase regulator - rat |
| <i>pir:S32494</i> | S32494 glucokinase regulator - rat |

Tab. 3.14: Ergebnisse der Datenbankanalysen auf die Konsensuspeptidsequenz **X-L-S-A-X-V-A-G-X**

Da eine kristallographische Darstellung des Glucokinase-Regulatorproteins zur Zeit nicht verfügbar ist, kann das Konsensusmotiv nicht einer definierten Proteindomäne zugeordnet werden. Trotz intensiver Recherchen in den Proteindatenbanken konnte für die Konsensuspeptidsequenz (1.) **A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L** und Teile des Dodekapeptids keine Homologie zu bekannten Proteinen festgestellt werden.

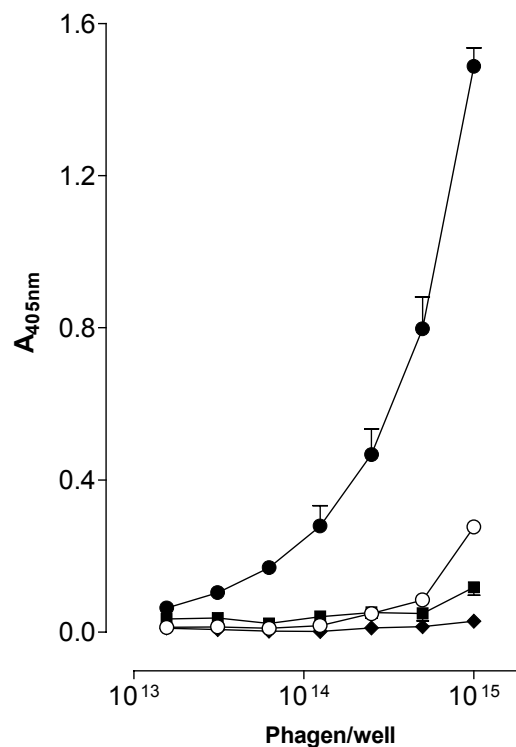


Abb. 3.6: Charakterisierung der Glucokinase-Bindungsaffinität der die Bindungsregion des **Glucokinase-Regulatorprotein tragenden Konsensuspeptidsequenz (2.) durch ELISA**

Der konsensussequenztragende Phagenklon und ein Phagenklon aus dem Panning K (Kontrollphage) wurden amplifiziert und in einem Phagenbindungstest auf Glucokinase gekoppelten (GK-Strip) und zur Kontrolle auf mit Milchpulver geblockten (K-Strip) Ni-NTA-HisSorb-Strips inkubiert. Ungebundene Phagen wurden durch Waschen entfernt und gebundene Phagen mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-M13 Antikörper detektiert. Die Enzymfarbreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 20 min spektrophotometrisch (OD 405 nm) quantifiziert.

- = Phagenklon mit der Peptidsequenz (2.) **E-Y-L-S-A-I-V-A-G-P-W-P**/GK-Strip,
- = Phagenklon mit der Peptidsequenz (2.) **E-Y-L-S-A-I-V-A-G-P-W-P**/K-Strip.

■ = Kontrollphage/ GK-Strip, ◆ = Kontrollphage/ K-Strip. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

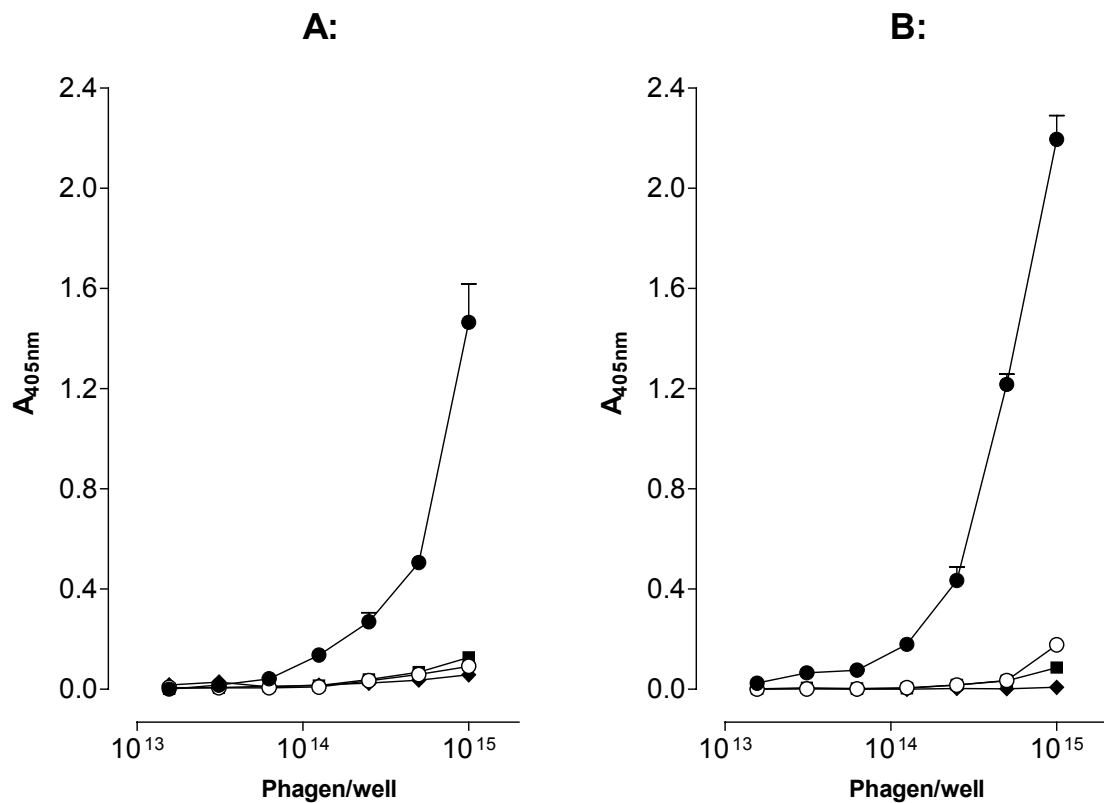


Abb. 3.7: Charakterisierung der Glucokinase-Bindungsaffinität der die Bindungsregion der PFK2 tragenden Konsensuspeptidsequenz (3.) durch ELISA

Die konsensussequenztragenden Phagenklone und ein Phagenklon aus dem Panning K (Kontrollphage) wurden amplifiziert und in einem Phagenbindungstest auf Glucokinase gekoppelten (GK-Strip) und zur Kontrolle auf mit Milchpulver geblockten (K-Strip) Ni-NTA-HisSorb-Strips inkubiert. Ungebundene Phagen wurden durch Waschen entfernt und gebundene Phagen mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-M13 Antikörper detektiert. Die Enzymfarbreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 20 min spektrophotometrisch (OD 405 nm) quantifiziert.

A: ● = Phagenklon mit der Peptidsequenz (3.) K-V-W-T-V-N-P-V-W-P-P-G/GK-Strip,

○ = Phagenklon mit der Peptidsequenz (3.) K-V-W-T-V-N-P-V-W-P-P-G/K-Strip.

B: ● = Phagenklon mit der Peptidsequenz (3.) H-G-M-K-V-W-T-L-P-A-T-S/GK-Strip,

○ = Phagenklon mit der Peptidsequenz (3.) H-G-M-K-V-W-T-L-P-A-T-S/K-Strip.

■ = Kontrollphage/ GK-Strip, ♦ = Kontrollphage/ K-Strip. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

Um die Bindung der drei Konsensuspeptide an die Glucokinase zu überprüfen, wurden vier konsensussequenztragende Phagen und ein Phagenklon aus dem Panning K (Kontrollphage) amplifiziert. Die Phagen wurden in serieller Verdünnung auf Glucokinase gekoppelten und zur Kontrolle auf mit Milchpulver geblockten Ni-NTA-HisSorb-Strips inkubiert. Gebundene Phagen wurden mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-M13-

Antikörper detektiert. Dabei zeigte der Kontrollphage im Bindungstest keine Affinität zur Glucokinase oder zum Milchpulver. Alle konsensussequenztragenden Phagen zeigten eine signifikante Bindung an die Glucokinase und keine Bindung an Milchpulver (Abbildung 3.8 – 3.10).

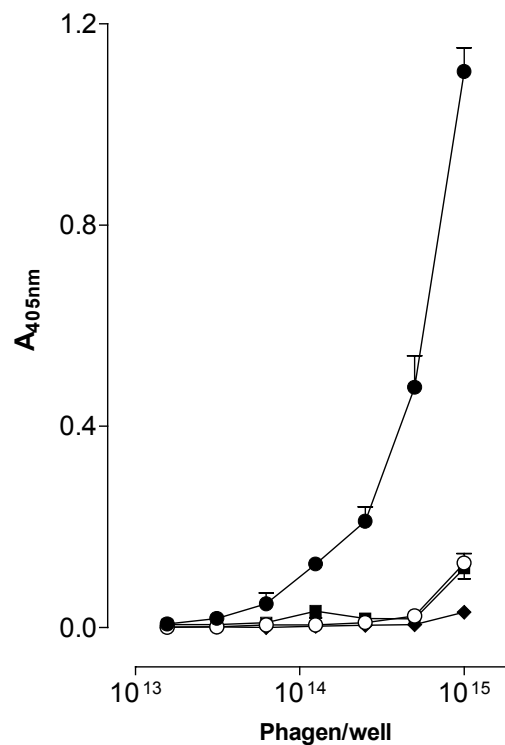


Abb. 3.8: Charakterisierung der Glucokinase-Bindungsaffinität der **A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L** Konsensuspeptidsequenz (1.) durch ELISA

Der konsensussequenztragende Phagenklon und ein Phagenklon aus dem Panning K (Kontrollphage) wurden amplifiziert und in einem Phagenbindungstest auf Glucokinase gekoppelten (GK-Strip) und zur Kontrolle auf mit Milchpulver geblockten (K-Strip) Ni-NTA-HisSorb-Strips inkubiert. Ungebundene Phagen wurden durch Waschen entfernt und gebundene Phagen mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-M13 Antikörper detektiert. Die Enzymfarbreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 20 min spektrophotometrisch (OD 405 nm) quantifiziert.

- = Phagenklon mit der Peptidsequenz (1.) **A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L**/GK-Strip,
- = Phagenklon mit der Peptidsequenz (1.) **A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L** /K-Strip.

■ = Kontrollphage/ GK-Strip, ◆ = Kontrollphage/ K-Strip. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.3 Expression der Glucokinase bindenden Proteine in *E. coli* und *S. pombe*: Das Glucokinase-Regulatorprotein und die 6-Phosphofructose-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase

Durch die *Phage Display* Selektionierung konnte gezeigt werden, daß Proteindomänen der PFK2 und des GRP spezifisch mit der Glucokinase interagieren. Daher sollte nun im nächsten Schritt die Interaktion der nativen Holoproteine durch in vitro Bindungsstudien charakterisiert werden. Hierzu wurden die 6-Phosphofructose-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase und das Glucokinase-Regulatorprotein rekombinant in *E. coli* Bakterien und *S. pombe* Hefezellen exprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt.

3.3.1 Expression der Proteine in *E. coli*

Nach Aufreinigung des durch PCR gewonnenen kodierenden 0,7 kb Fructose-2,6-bisphosphatase-cDNA-Fragments, 1,4 kb PFK2-cDNA-Fragments und 1,8 kb GRP-cDNA-Fragments wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I durchgeführt und die Fragmente jeweils mit dem linearisierten und dephosphorylierten Vektor pGEX ligiert. Der ligierte Vektor wurde in den *E. coli* BL21 transformiert. Aus den ampicillinresistenten Bakterienklonen wurde durch Minipräparation das Plasmid isoliert. Bei positiven Klonen konnte durch Restriktionsschnittanalyse das jeweilige Fragment nachgewiesen werden. Die cDNA Fragmente waren nach der Subklonierung im korrekten Leserahmen am N-terminalen Ende mit der Glutathion-S-Transferase verknüpft. Sequenzanalysen der cDNA Fragmente zeigten keine Mutationen durch die PCR-Amplifikation des kodierenden Bereichs.

Anschließend erfolgte die Expression der GST-Fusionsproteine in einem Kulturvolumen von 250 ml. Nach einer vierstündigen Induktion mit IPTG (0,2 mM) war nur das Fructose-2,6-bisphosphatase Fusionsprotein im Vergleich zur nichtinduzierten Kontrollkultur als 50 kDa-Protein im Überstand des zentrifugierten bakteriellen Lysats nachweisbar (Daten nicht abgebildet).

Dieses Fusionsprotein konnte durch Bindung an Glutathion Sepharose 4B mit anschließender dreimaliger Elution mit reduziertem Glutathion aufgereinigt werden (Abbildung 3.9) und in der *Western Blot*-Analyse mit Anti-GST-Antikörper der Ziege (Abbildung 3.10) detektiert werden. Durch gezielten Verdau des GST-Fructose-2,6-

bisphosphataseproteins während der Bindung an Glutathion Sepharose 4B konnte die Fructose-2,6-bisphosphatase als 31 kDa Protein (Abbildung 3.11) eluiert werden. Die durchschnittliche Ausbeute aus einer induzierten 250 ml Bakterienkultur betrug 1000 – 1200 µg aufgereinigtes GST-Fructose-2,6-bisphosphataseprotein oder 200 – 300 µg aufgereinigtes Fructose-2,6-bisphosphataseprotein.

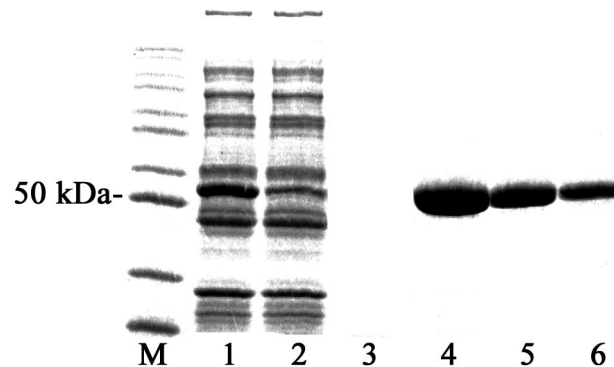


Abb. 3.9: Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins GST-Fructose-2,6-bisphosphatase in *E. coli* BL21

M = Molekulargewichtsmarker (kDa) **1** = IPTG-induziertes Bakterienlysat, **2** = *Flow through* nach Säulenbindung an Glutathion Sepharose 4B, **3** = Waschfraktion der Glutathion Sepharose 4B, **4** = Eluat 1, **5** = Eluat 2, **6** = Eluat 3. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aus einer 250 ml *E. coli*-Kultur erhaltenen Fraktionen. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

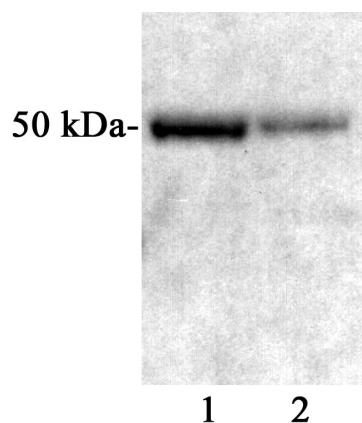


Abb. 3.10: Western Blot-Analyse des Fusionsproteins GST-Fructose-2,6-bisphosphatase

1 = Eluat 1, **2** = Eluat 2. 10 µl des aufgereinigten Proteineluats einer 250 ml *E. coli*-Kultur wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit dem Anti-GST-Antikörper und dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper Anti-Ziege-IgG des Esels wurde das Fusionsprotein durch Chemilumineszenz detektiert.

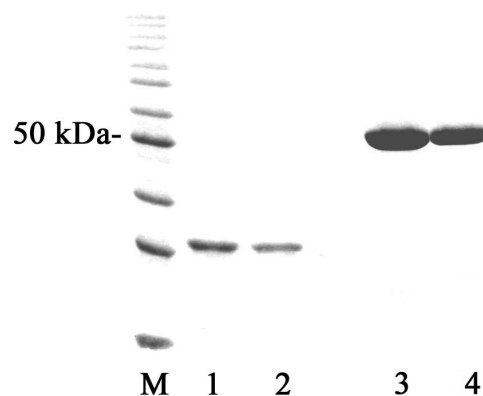


Abb. 3.11: Gezielter Verdau des Fusionsproteins GST-Fructose-2,6-bisphosphatase durch PreScission Protease

M = Molekulargewichtsmarker (kDa) **1** = Eluat 1, **2** = Eluat 2. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl des aufgereinigten und PreScission Protease verdauten Proteins einer 250 ml *E. coli*-Kultur. **3** = Eluat 1, **4** = Eluat 2. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl des aufgereinigten Proteineluats einer 250 ml *E. coli*-Kultur. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

Auch bei optimierten Kultur- und Induktionsbedingungen konnten das PFK2- und GRP-Protein im Überstand des zentrifugierten bakteriellen Lysats nicht detektiert werden. So mußte davon ausgegangen werden, daß es aufgrund einer inkorrekten posttranslationalen Auffaltung der Proteine zu einer Bildung von Proteineinschlußkörperchen gekommen ist, die sich als hydrophobe Proteinaggregate nach Zentrifugation des bakteriellen Lysats im Pellet befinden. Um diese ebenfalls aufzuschließen, wurde eine weitere Bakterienlyse mit 1% Sarkosyl, einem anionischen Detergenz durchgeführt. Im Coomassie Blau gefärbten 10 %igen SDS-Gel war sowohl die 85 kDa Bande des GST-PFK2-Fusionsproteins aus einer induzierten pGEX-PFK2 Kultur als auch die 100 kDa Bande des GST-GRP-Fusionsproteins aus einer induzierten pGEX-GRP Kultur sichtbar (Daten nicht abgebildet). Da die Ausbeute beider Proteine sehr gering ausfiel und bei einer Sarkosylkonzentration von 1% von einem erheblichen Funktionsverlust der Proteine ausgegangen werden mußte, wurde die PFK2 und das GRP rekombinant in Hefezellen exprimiert. Um die kinetischen Eigenschaften der aufgereinigten rekombinanten Fructose-2,6-bisphosphatase mit und ohne GST-Tag zu charakterisieren, wurde das GST-Tag-Fructose-2,6-bisphosphatase-Fusionsprotein sowohl als solches direkt von der Sepharose eluiert (Abbildung 3.11, Bahn 3 und 4) als auch mit PreScission Protease während der Säulenbindung geschnitten, um die native Fructose-2,6-bisphosphatase zu erhalten (Abbildung 3.11, Bahn 1 und 2).

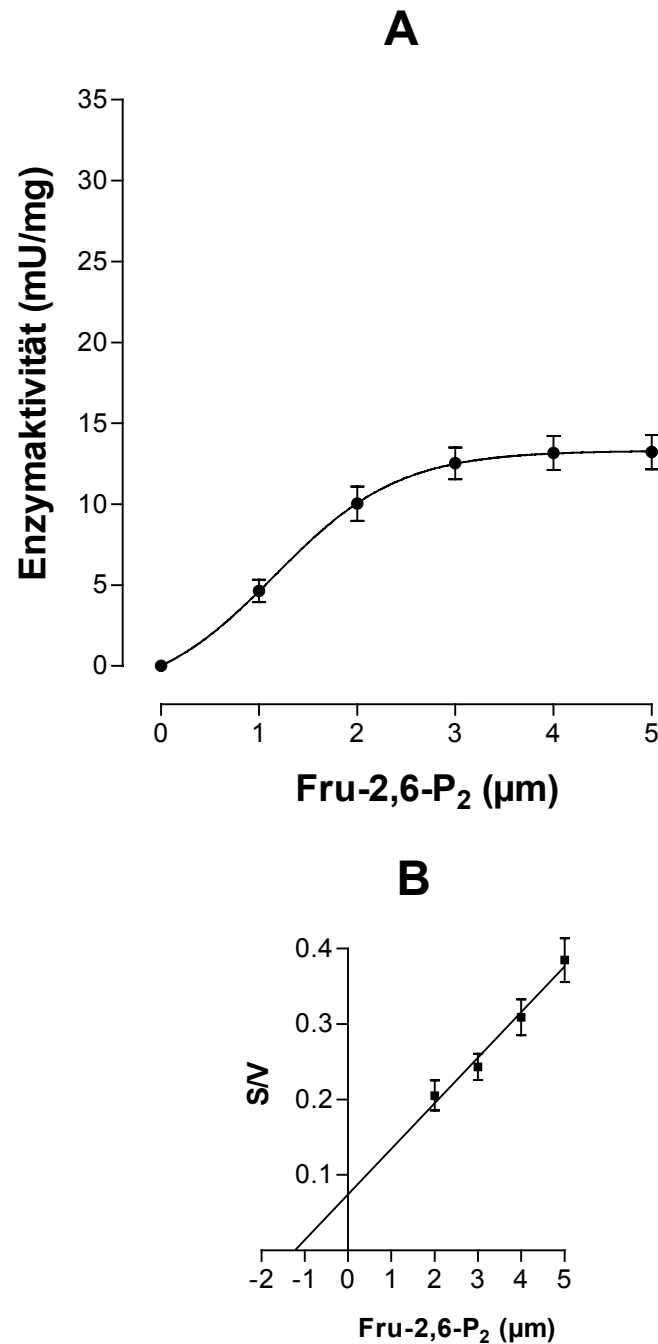


Abb. 3.12: Konzentrationsabhängige Dephosphorylierung von Fructose-2,6-bisphosphat durch die rekombinante GST-*Tag*-Fructose-2,6-bisphosphatase

30 µl des aufgereinigten GST-*Tag*-Fructose-2,6-bisphosphatase-Proteineluats wurden mit Fructose-2,6-bisphosphat in aufsteigender Konzentration versetzt und die Zunahme von NADPH in einem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gekoppelten Assay photometrisch bestimmt und als spezifische Aktivität in mU/mg Protein ausgedrückt. **A** = nichtlineare Regressionsanalyse der Fructose-2,6-bisphosphatase Enzymaktivität. **B** = lineare Regressionsanalyse der nach Hanes-Woolf (S/V gegen S) transformierten Daten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Experimenten.

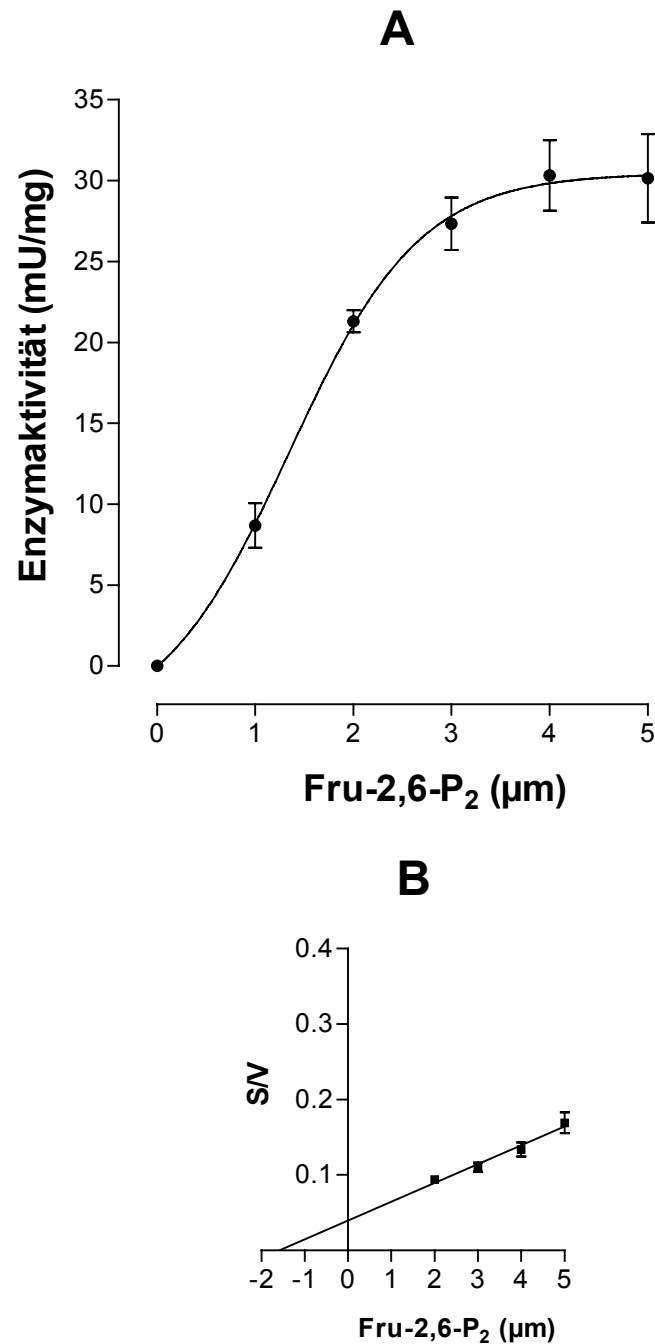


Abb. 3.13: Konzentrationsabhängige Dephosphorylierung von Fructose-2,6-bisphosphat durch die rekombinante Fructose-2,6-bisphosphatase

30 µl des aufgereinigten Fructose-2,6-bisphosphatase-Proteineluats wurden mit Fructose-2,6-bisphosphat in aufsteigender Konzentration versetzt und die Zunahme von NADPH in einem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gekoppelten Assay photometrisch bestimmt und als spezifische Aktivität in mU/mg Protein ausgedrückt. **A** = nichtlineare Regressionsanalyse der Fructose-2,6-bisphosphatase Enzymaktivität. **B** = lineare Regressionsanalyse der nach Hanes-Woolf (S/V gegen S) transformierten Daten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Experimenten.

Für das Substrat Fructose-2,6-bisphosphat und das Enzym GST-*Tag*-Fructose-2,6-bisphosphatase wurde ein V_{\max} -Wert von 13 mU/mg Protein und ein K_m -Wert von 1,2 μM ermittelt (Abbildung 3.12). Ein V_{\max} -Wert von 30 mU/mg Protein und ein K_m -Wert von 1,5 μM (Abbildung 3.13) ergab die Messung für das Substrat Fructose-2,6-bisphosphat und das Enzym Fructose-2,6-bisphosphatase. Damit entsprechen die Werte der Fructose-2,6-bisphosphatase denen der Literatur für das aufgereinigte bifunktionelle Leberenzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase unter gleichen Versuchsbedingungen (Bertrand *et al.* 1997; Rider *et al.* 1995; Tauler *et al.* 1989; Tauler *et al.* 1988). Dabei ist zu berücksichtigen, daß der hier durchgeführte Assay zur Bestimmung des gebildeten Fructose-6-phosphats das Enzym im Bereich der Zweisubstrat-Zweiprodukthemmung mit einer Erhöhung des K_m -Werts und einer Erniedrigung des V_{\max} -Werts charakterisiert (Van Schaftingen *et al.* 1982). Die etwa 50 %ige Erniedrigung des V_{\max} -Werts des GST-*Tag*-Enzyms im Vergleich zur Fructose-2,6-bisphosphatase bei etwa gleichem K_m -Wert muß auf eine sterische Hinderung durch die Glutathion-S-Transferase zurückgeführt werden.

Die rekombinante Aufreinigung der Fructose-2,6-bisphosphatase und der Nachweis ihrer katalytischen Aktivität erlaubten die Klärung der Frage, ob die Interaktion der Glucokinase mit der Fructose-2,6-bisphosphatase die kinetischen Eigenschaften der Enzyme im Sinne einer Hemmung oder Aktivierung beeinflusst. Die Koinkubation von 1,5 μg rekombinanter β -Zell Glucokinase mit 1,5 – 5 μg Fructose-2,6-bisphosphatase hatte keinen signifikanten Einfluß auf die K_m - und V_{\max} -Werte der beiden Enzyme ($n = 3$ /Proteinmengenratio, Daten nicht abgebildet). Somit bedingt die Bindung der Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne an die Glucokinase keine Veränderung der kinetischen Eigenschaften der Enzyme.

3.3.2 Expression der rekombinanten PFK2 und des GRP in *S. pombe*

Aufgrund der inkorrekten posttranslationalen Auffaltung war in Bakterien keine erfolgreiche Expression der Proteine PFK2 und GRP möglich. Da in Hefen eine posttranslationale Modifikation von Proteinen besser erfolgt, wurde ein thiaminreguliertes Hefesystem zur Proteinexpression der PFK2 und des GRP eingesetzt.

Nach Aufreinigung des durch PCR gewonnenen kodierenden 1,4 kb PFK2-cDNA-Fragments und 1,8 kb GRP-cDNA-Fragments wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Sma*I durchgeführt und die Fragmente jeweils mit dem linearisierten

und dephosphorylierten Vektor pESP ligiert. Der ligierte Vektor wurde in *E. coli* JM109 transformiert. Aus den ampicillinresistenten Bakterienklonen wurde durch Minipräparation das Plasmid isoliert. Mit Hilfe von Restriktionsschnittanalysen und Sequenzanalysen wurde die korrekte Subklonierung in positiven Klonen überprüft. Anschließend wurde das jeweilige Plasmid in *S. pombe* transformiert. Hefeflüssigkulturen wurden in thiaminhaltigem Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 vermehrt und die Zellen bei 1000 g pelletiert und zweimal mit dd H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 400 ml thiaminfreiem Medium für 20 h induziert. Im Vergleich zur jeweils nicht induzierten Kontrollkultur war ein 85 kDa PFK2-Protein und ein 100 kDa GRP-Protein im Überstand des zentrifugierten Hefezelllysats nachweisbar (Daten nicht abgebildet). Ebenso war es möglich, die Fusionsproteine durch Bindung an Glutathion Sepharose 4B mit anschließender dreimaliger Elution mit reduziertem Glutathion aufzureinigen (Abbildung 3.15 und 3.16). Die Proteine konnten im *Western Blot* mit Anti-GST-Antikörper detektiert werden (Abbildung 3.14).

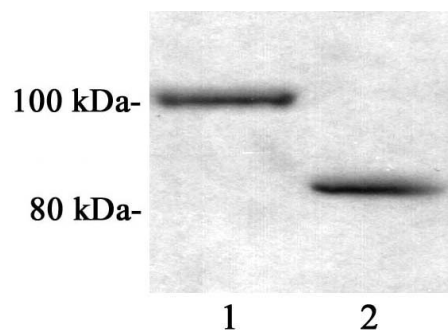


Abb. 3.14: *Western Blot*-Analysen der Fusionsproteine GST-GRP und GST-PFK2

1 = GST-GRP, **2** = GST-PFK2. 10 µl des aufgereinigten Proteineluats einer 400 ml *S. pombe*-Kultur wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit dem Anti-GST Antikörper und dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper Anti-Ziege-IgG des Esels wurde das Fusionsprotein durch Chemilumineszenz detektiert.

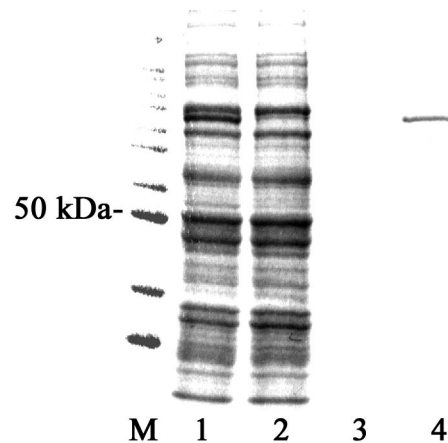


Abb. 3.15: Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins GST-PFK2 in *S. pombe*

M = Molekulargewichtsmarker (kDa) **1** = Hefezellysate, **2** = *Flow through* nach Säulenbindung an Glutathion Sepharose 4B, **3** = Waschfraktion der Glutathion Sepharose 4B, **4** = Eluat. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aus einer 400 ml *S. pombe*-Kultur erhaltenen Fraktionen. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

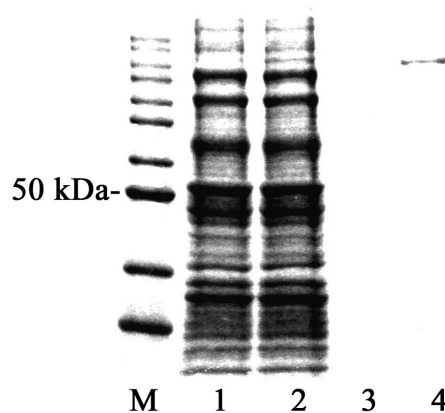


Abb. 3.16: Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins GST-GRP in *S. pombe*

M = Molekulargewichtsmarker (kDa) **1** = *Flow through* nach Säulenbindung an Glutathion Sepharose 4B, **2** = Hefezellysate, **3** = Waschfraktion der Glutathion Sepharose 4B, **4** = Eluat. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aus einer 400 ml *S. pombe*-Kultur erhaltenen Fraktionen. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

Durch die Thrombinerkennungssequenz zwischen dem GST und dem exprimierten Protein PFK2 bzw. GRP sollte eine dem bakteriellen System vergleichbare Abtrennung des *Tags* möglich sein. Nach Verdau des Fusionsproteins durch Thrombin war im 10%igen SDS-Gel

allerdings eine Proteinleiter zu sehen (Daten nicht abgebildet), die auf eine mangelnde Spezifität hindeutet. So war es nicht möglich, die Glutathion-S-Transferase ohne Zerstörung des Gesamtproteins abzutrennen. Die durchschnittliche Ausbeute aus einer 400 ml pESP-GRP Kultur betrug 40 – 50 µg Protein und aus einer 400 ml pESP-PFK2 Kultur 100 – 150 µg Protein.

Die kinetischen Charakteristika des bifunktionellen Enzyms GST-Tag-PFK2 sind in Tabelle 3.15 angegeben.

| Enzymaktivität | GST-Tag-PFK2 |
|--|---------------|
| 6-Phosphofructo-2-kinase V_{\max} (mU/mg) | 15 ± 1 |
| Fructose-2,6-bisphosphatase V_{\max} (mU/mg) | 28 ± 2 |
| K_m (µM) | $1,2 \pm 0,2$ |

Tab. 3.15: Kinetische Charakteristika des bifunktionellen Enzyms GST-Tag-PFK2

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten. Die Fructose-2,6-bisphosphatase-Enzymaktivität wurde in einem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gekoppelten Assay photometrisch bestimmt. K_m - und V_{\max} -Werte wurden durch lineare Regressionsanalyse nach Hanes-Woolf-Transformation ermittelt. Der V_{\max} -Wert der 6-Phosphofructo-2-kinase-Enzymaktivität wurde durch Bestimmung der unter Substratüberschuß in 10 min gebildeten Fructose-2,6-bisphosphatmenge ermittelt.

Die bestimmten V_{\max} - und K_m -Werte für die Fructose-2,6-bisphosphatase sind denen der rekombinant exprimierten Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne vergleichbar. Der für das Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase und das Substrat Fructose-6-phosphat ermittelte V_{\max} -Wert von 15mU/mg entspricht der Literatur (Kurland *et al.* 1993; Tauler *et al.* 1989).

3.3.3 Expression des rekombinanten GRP mit dem Vektor pESP-PS-GRP

Um das Glucokinase-Regulatorprotein als natives Protein rekombinant herzustellen, wurde die PreScission Erkennungssequenz in den Hefevektor pESP integriert. Mit diesem neuen vektoriellen System konnte eine dem bakteriellen System vergleichbare Abtrennung des GST-Tags ohne Verdau des Fusionsproteins erreicht werden (Abbildung 3.17).

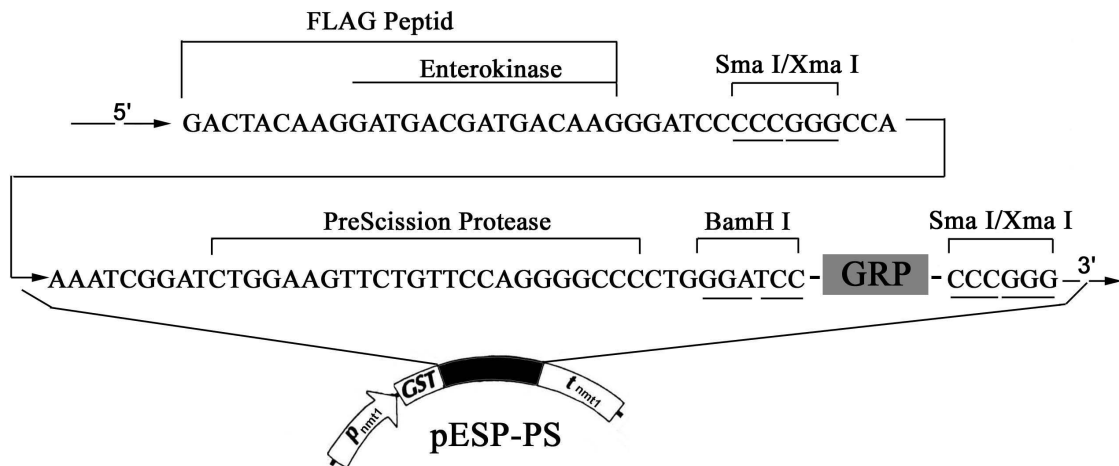


Abb. 3.17: Der Expressionsvektor pESP-PS-GRP

Unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *XmaI* erfolgte die Subklonierung der PreScission Proteasesequenz und der GRP-cDNA in den Expressionsvektor pESP.

Nach Aufreinigung des durch PCR unter Verwendung des Plasmids pGEX-GRP als *Template* gewonnenen kodierenden 1,8 kb Fragments PreScission-Protease-Erkennungssequenz-GRP-cDNA wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *XmaI* durchgeführt. Das Fragment wurde mit dem linearisierten und dephosphorylierten Vektor pESP ligiert. Der ligierte Vektor wurde in *E. coli* JM109 transformiert. Aus den ampicillinresistenten Bakterienklonen wurde durch Minipräparation das Plasmid isoliert. Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *PstI* konnten Klone mit der korrekten Orientierung selektioniert werden (Abbildung 3.18). Sequenzanalysen des Fragments zeigten keine Mutationen durch die PCR-Amplifikation der PreScission-Protease-Erkennungssequenz und der GRP-cDNA. Anschließend wurde das Plasmid pESP-PS-GRP in *S. pombe* transformiert. Nach der Expression konnte das Fusionsprotein sowohl als solches direkt von der Glutathion Sepharose 4B eluiert werden, als auch durch gezielten Verdau mit PreScission Protease das 68 kDa GRP-Protein erhalten werden (Abbildung 3.19). Wurde das Fusionsprotein durch PreScission Protease bereits während der Bindung an die Sepharose behandelt, blieben das GST sowie die PreScission Protease an der Säule zurück und das GRP konnte als reine Fraktion eluiert werden. Die durchschnittliche Ausbeute aus einer 400 ml Hefezellkultur betrug 30 – 40 µg Protein. Mit diesen Proteinmengen wurde in einem enzymgekoppelten photometrischen Test eine Hemmung der Glucokinase-

Enzymaktivität durch das rekombinant exprimierte GRP beobachtet (Daten nicht abgebildet).

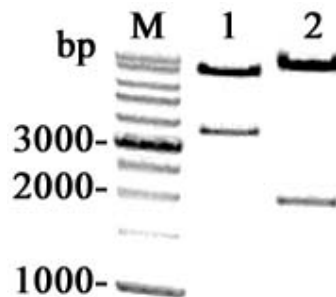


Abb. 3.18: *PstI* Restriktionsschnittanalyse der Plasmid-DNA isolierter Bakterienklone aus der Transformation von *E. coli* JM109 mit dem Ligationsansatz PS-GRP in pESP

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. **M** = Molekulargewichtsstandard, **1** = Klon 1 mit korrekter Orientierung des Inserts PS-GRP in den Expressionsvektor pESP, **2** = Klon 2 mit verkehrter Orientierung des Inserts PS-GRP in den Expressionsvektor pESP.

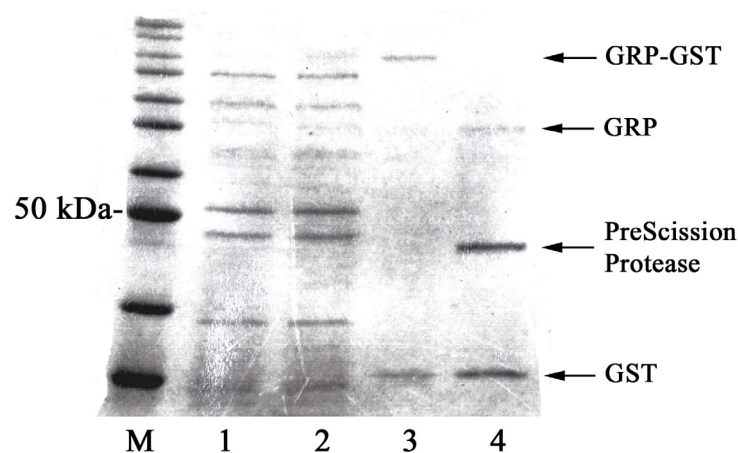


Abb. 3.19: Expression, Aufreinigung und gezielter Verdau mit PreScission Protease des Fusionsproteins GST-GRP in *S. pombe*

M = Molekulargewichtsmarker (kDa) **1** = *Flow through* nach Säulenbindung an Glutathion Sepharose 4B, **2** = Hefezellysat, **3** = Eluat nach Aufreinigung über Glutathion Sepharose 4B, **4** = mit PreScission Protease behandeltes Eluat. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aus einer 400 ml *S. pombe*-Kultur erhaltenen Fraktionen. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

3.4 Charakterisierung der PFK2- und der GRP-Bindung an die Glucokinase im Magnetocapture Assay

Um die Bindung der exprimierten Proteine Fructose-2,6-bisphosphatase und GRP an die Glucokinase zu analysieren, wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Dabei wurde die effektive und unter Wahrung der katalytischen Aktivität erfolgende Bindung der His₆-Tag-Glucokinase an Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* genutzt. Aus einer Inkubationslösung wurden die His₆-Tag-Glucokinase und mit ihr interagierende Proteine durch die magnetischen Partikel mit Hilfe eines Magneten separiert. Nach Abtrennung der Proteine von den *Magnetic Agarose Beads* wurden sie in der SDS-Page analysiert. In einer Kontrollreaktion mit 10 µg BSA konnte gezeigt werden, daß es nicht zu einer unspezifischen Bindung von Proteinen an den His₆-Tag-Glucokinase-Ni-NTA *Magnetic Agarose Bead*-Komplex kommt (Abbildung 3.20, Bahn 4). In den *Magnetocapture Assays* konnte eine Bindung der Fructose-2,6-bisphosphatase (Abbildung 3.20, Bahn 1) und des Glucokinase-Regulatorproteins (Abbildung 3.21, Bahn 3) an die Glucokinase gezeigt werden.

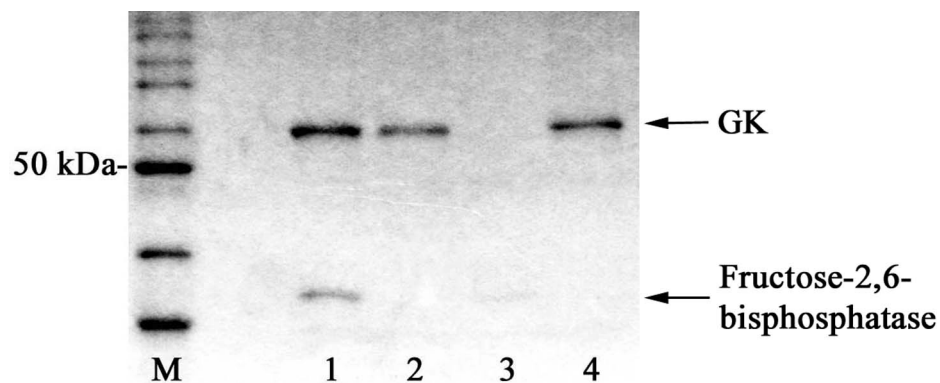


Abb. 3.20: Bindung der Fructose-2,6-bisphosphatase an die Glucokinase im Magnetocapture Bindungsassay

M = Molekulargewichtsmarker (kDa), **1** = 3 µg His₆-Tag-GK wurden mit 6 µg rekombinanter Fructose-2,6-bisphosphatase inkubiert, **2** = 3 µg His₆-Tag-GK wurden inkubiert, **3** = 6 µg rekombinante Fructose-2,6-bisphosphatase wurden inkubiert, **4** = 3 µg His₆-Tag-GK wurden mit 10 µg BSA inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 500 µl Bindungspuffer. Die Proteine wurden durch Zusatz von 10 µl Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* separiert und der Komplex anschließend mit Bindungspuffer gewaschen. Durch Erhitzen wurden die Proteine von den *Beads* gelöst und in der SDS-Page analysiert. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

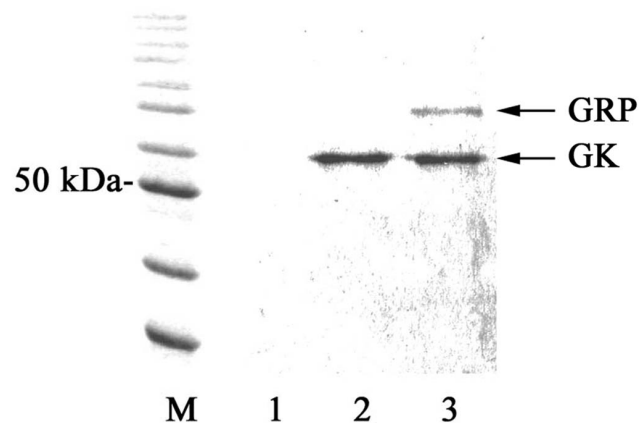


Abb. 3.21: Bindung des Glucokinase-Regulatorproteins an die Glucokinase im Magnetocapture Bindungsassay

M = Molekulargewichtsmarker (kDa), **1** = 6 μ g rekombinantes Glucokinase-Regulatorprotein wurden inkubiert, **2** = 3 μ g His₆-Tag-GK wurden inkubiert, **3** = 3 μ g His₆-Tag-GK wurden mit 6 μ g rekombinantes Glucokinase-Regulatorprotein inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 500 μ l Bindungspuffer. Die Proteine wurden durch Zusatz von 10 μ l Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* separiert und der Komplex anschließend mit Bindungspuffer gewaschen. Durch Erhitzen wurden die Proteine von den *Beads* gelöst und in der SDS-Page analysiert. Die Abbildung zeigt ein Coomassie Blau gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.

3.5 Charakterisierung der PFK2- und der GRP-Bindung an die Glucokinase im Two Hybrid System

Das *Two Hybrid* System stellt eine analytische Methode dar, die es erlaubt, Proteinwechselwirkungen *in vivo* zu testen. Der Transkriptionsaktivator GAL4 aus der Hefe *S. cerevisiae* ist essentiell für die Expression von Enzymen des Galaktosestoffwechsels. Er besteht aus zwei separaten Domänen, der aminoterminalen DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer carboxyterminalen sauren Aktivierungsdomäne (AD) des RNA-Polymerasekomplexes. Die direkte kovalente Bindung zwischen diesen Domänen kann durch andere Proteinabschnitte ersetzt werden. Exprimiert man zwei Proteine, die miteinander jeweils als Hybride mit AD und BD interagieren, so werden letztere durch die Wechselwirkung der Proteine zusammengebracht und der Transkriptionsaktivator ist funktionell aktiv. Als Indikator der GAL4-Aktivität dient einerseits das Reportergen *LacZ* und andererseits das induzierte *HIS3* Genprodukt, welches einen Wachstumsdefekt der Hefe, die Histidinabhängigkeit, komplementiert und so ein Wachstum auf Selektionsmedium erlaubt. Im verwendeten MATCHMAKER System 2 von

Clontech enthält der Vektor pACT2 die Sequenz für die AD und trägt das *LEU2* Gen als Selektionsmarker, während pAS2-1 mit dem Marker *TRP2* die Sequenz für die DNA-BD codiert.

Von der humanen β -Zell Glucokinase (hIGK), der humanen Leber Glucokinase (hLGK), dem Glucokinase-Regulatorprotein der Rattenleber (GRP), der Rattenleber 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (PFK2), der Rattenleber 6-Phosphofructo-2-kinase (Ki) und der Rattenleber Fructose-2,6-bisphosphatase (F26P₂ase) wurden Fusionsproteine sowohl mit der DNA-Bindungs- als auch mit der Aktivierungsdomäne hergestellt. Die zur Subklonierung verwendeten kodierenden Fragmente wurden durch PCR-Amplifikation generiert und nach Restriktionsverdau mit den linearisierten und dephosphorylierten Vektoren pAS2-1 und pACT2 ligiert. Die ligierten Vektoren wurden in *E. coli* JM109 transformiert. Aus den ampicillinresistenten Bakterienklonen wurde durch Minipräparation das Plasmid isoliert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und Sequenzanalysen wurde die korrekte Subklonierung in positiven Klonen überprüft. Um auszuschließen, daß das Fusionsprotein alleine eine Reportergenaktivierung hervorruft, wurden zuerst Kontrollversuche durchgeführt, in denen das jeweilige AD-Fusionsprotein nur mit der BD oder das BD-Fusionsprotein nur mit der AD in Hefen exprimiert wurde. Unter den Testbedingungen konnte keine Expression der Reportergene detektiert werden (Daten nicht abgebildet). Zellen der *S. cerevisiae* Stämme CG1945 und Y190 wurden daraufhin in paarweiser Kombination mit den synthetisierten pAS2-1- und pACT2-Vektoren kotransformiert und auf SD-L/T-Agarplatten aufgebracht. Nach etwa vier Tagen waren Kolonien auf einen Durchmesser von 1–2 mm herangewachsen, und einzelne Kolonien wurden jeweils in Flüssigmedium amplifiziert. Diese Kulturen wurden zum Anlegen einer Erhaltungskultur und zur Proteinpräparation verwendet.

Um die Expression der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden jeweils *Western Blot*-Analysen der Proteinpräparationen mit GAL4 DNA-BD und GAL4 AD monoklonalem Antikörper durchgeführt. In Abbildung 3.22 ist exemplarisch der Nachweis der Proteinsynthese des Fusionsproteins BD-Glucokinase in mit pAS2-1(BD)-hIGK und pACT2(AD)-GRP kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945 und Y190 dargestellt. Nicht transformierte Hefen dienten der Kontrolle (Bahn 1 und 2).



Abb. 3.22: Western Blot-Analysen des Fusionsproteins Bindungsdomäne-Glucokinase aus kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945 und Y190

1 = *S. cerevisiae* CG1945, **2** = *S. cerevisiae* Y190, **3** = *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit dem Plasmid pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-GRP, **4** = *S. cerevisiae* Y187 transformiert mit dem Plasmid pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-GRP. Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 20 µl des Aufschlusses wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit dem GAL4 DNA-BD monoklonalen Antikörper und dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG der Ziege wurde das Bindungsdomäne-Glucokinase Fusionsprotein durch Chemilumineszenz detektiert.

Zum Nachweis der *HIS3*-Reportergenaktivierung in *S. cerevisiae* CG1945 wurden jeweils 10 µl der Erhaltungskultur parallel auf SD-L/T- und SD-L/T/His + 5 mM 3-AT (3-Aminothiazol)-Agarplatten ausgestrichen. Die SD-L/T-Agarplatten dienen der erneuten Wachstumskontrolle der kotransformierten Hefen. Das Wachstum von Hefen auf den histidinfreien SD-L/T/His + 5 mM 3-AT-Agarplatten zeigte eine Interaktion der exprimierten Proteine an. Da die Reportergeneinheit aus der GAL1 UAS, dem *HIS3*-Promotor und dem *HIS3*-Gen eine geringe konstitutive Transkription zeigt, die zu einer Histidinunabhängigkeit der ansonsten histidinauxotrophen Hefezellen führt, ist dabei ein Zusatz von 5 mM des Histidinsynthetaseinhibitors 3-Aminothiazol (3-AT) zum SD-L/T/His-Medium wichtig, um die autonome Histidinsynthese zu unterdrücken. In Abbildung 3.23 – 3.29 sind SD-L/T- und SD-L/T/His + 5 mM 3-AT-Agarplatten als repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Dabei konnte keine GK-GK oder GRP-GRP Interaktion detektiert und damit bestätigt werden, daß beide Proteine als Monomer vorliegen. Die Bindung des GRP an die Glucokinase war durch Hefezellklone nach fünf Tagen auf der SD-L/T/His + 5 mM 3-AT-Agarplatte detektierbar, wenn das GRP im Assay als BD-Fusionsprotein exprimiert wird. Wurde die Agarplatte für weitere drei Tage inkubiert (Abbildung 3.23 B) zeigte auch der Ansatz mit den Proteinen AD-GRP und BD-GK ein positives Ergebnis. Da im *Western Blot* nur eine schwache Expression des AD-GRP-Proteins festgestellt werden konnte, ist das

zeitverzögerte Auftreten der Klone auf die niedrige Konzentration des Fusionsproteins zurückzuführen. Die Dimerisierung des bifunktionellen Enzyms PFK2 ließ sich im *Two Hybrid* Experiment eindeutig auf eine homophile Interaktion der 6-Phosphofructo-2-kinasedomäne zurückführen. Das AD-GK-Protein interagiert mit dem BD-PFK2-Protein und dem BD-F26P₂ase-Protein, nicht aber mit dem BD-Ki-Protein. So basiert die detektierte Interaktion der Glucokinase mit der PFK2 auf einer Bindung an die Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne. Die ausbleibende Reaktion bei reziproker Kombination der GAL4-Domänen ist hier ebenfalls durch eine niedrige Fusionsproteinkonzentration zu erklären. Bei allen durchgeführten Experimenten war das Interaktionsverhalten der β -Zell Glucokinase und der Leber Glucokinase mit der PFK2 und dem GRP identisch.

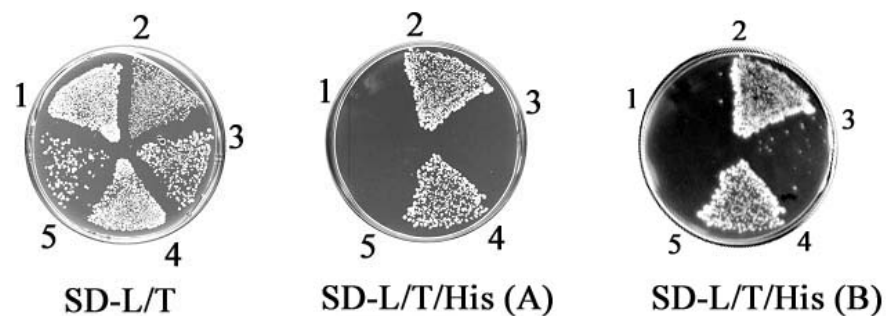


Abb. 3.23: Interaktion der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reporterogenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-GRP + pACT2(AD)-GRP, **2** = pAS2-1(BD)-GRP + pACT2(AD)-hIGK, **3** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-GRP, **4** = pAS2-1(BD)-GRP + pACT2(AD)-hLGK, **5** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-GRP. Es wurden jeweils etwa 10 μ l der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für **(A)** fünf Tage und **(B)** weitere drei Tage inkubiert.

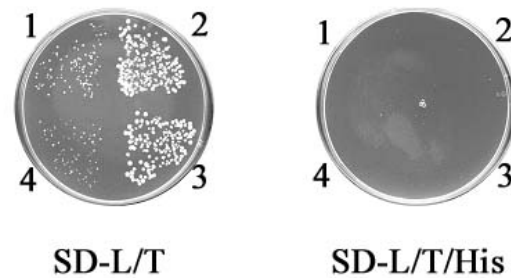


Abb. 3.24: Interaktion der Glucokinase im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reporterogenaktivität in kotransformierten *S.cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-hIGK, **2** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-hLGK, **3** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-hLGK, **4** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-hIGK. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert.

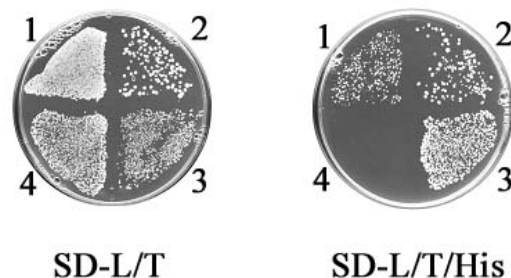


Abb. 3.25: Interaktion der Fructose-2,6-bisphosphatase und der 6-Phosphofructo-2-kinase im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reporterogenaktivität in kotransformierten *S.cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-F26P₂ase + pACT2(AD)-Ki, **2** = pAS2-1(BD)-Ki + pACT2(AD)-F26P₂ase, **3** = pAS2-1(BD)-Ki + pACT2(AD)-Ki, **4** = pAS2-1(BD)-F26P₂ase + pACT2(AD)-F26P₂ase. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert.

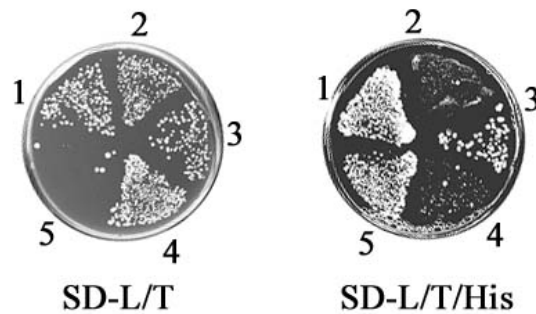


Abb. 3.26: Interaktion der PFK2, der Fructose-2,6-bisphosphatase und der 6-Phosphofructo-2-kinase im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reportergenaktivität in kotransformierten *S.cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-PFK2 + pACT2(AD)-PFK2, **2** = pAS2-1(BD)-PFK2 + pACT2(AD)-F26P₂ase, **3** = pAS2-1(BD)-PFK2 + pACT2(AD)-Ki, **4** = pAS2-1(BD)-F26P₂ase + pACT2(AD)-PFK2, **5** = pAS2-1(BD)-Ki + pACT2(AD)-PFK2. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert.

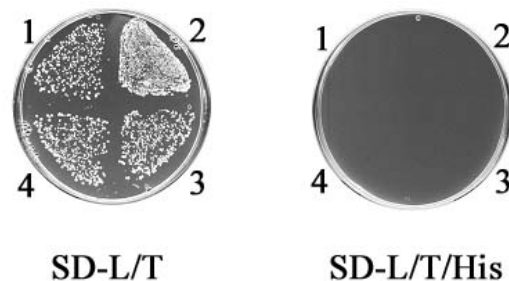


Abb. 3.27: Interaktion der Glucokinase und der 6-Phosphofructo-2-kinase im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reportergenaktivität in kotransformierten *S.cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-Ki + pACT2(AD)-hIGK, **2** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-Ki, **3** = pAS2-1(BD)-Ki + pACT2(AD)-hLGK, **4** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-Ki. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert.

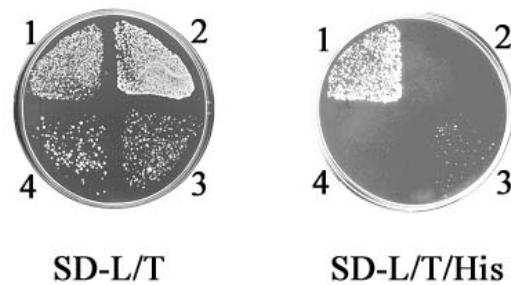


Abb. 3.28: Interaktion der Glucokinase und der PFK2 im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reporterogenaktivität in kotransformierten *S.cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-PFK2 + pACT2(AD)-hIGK, **2** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-PFK2, **3** = pAS2-1(BD)-PFK2 + pACT2(AD)-hLGK, **4** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-PFK2. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert.

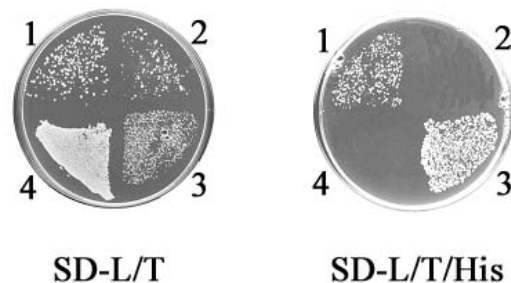


Abb. 3.29: Interaktion der Glucokinase und der Fructose-2,6-bisphosphatase im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reporterogenaktivität in kotransformierten *S.cerevisiae* CG1945

SD-L/T = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. *S. cerevisiae* CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-F26P₂ase + pACT2(AD)-hIGK, **2** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-F26P₂ase, **3** = pAS2-1(BD)-F26P₂ase + pACT2(AD)-hLGK, **4** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-F26P₂ase. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert.

Um die Spezifität des Assays zu erhöhen, wurde zusätzlich die Aktivierung des zweiten Reportergens β -Galactosidase überprüft. Dazu wurden jeweils Klone der SD-L/T-Agarplatten auf Filterpapier übertragen und die Hefezellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die anschließende Inkubation mit X-gal-haltigem Phosphatpuffer ergab bei einem aktivierten β -Galactosidasegen die Umwandlung des 5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosids zu einem blauen Farbstoff. Der als Positivkontrolle dienende transformierte Vektor pCL, der die komplette GAL4-Sequenz beinhaltet, zeigte bereits nach 1 h eine Blaufärbung auf dem Filterpapier. Positive Klone konnten erst nach einer Inkubationszeit von 5 h bei zusätzlich reduzierter Farbintensität detektiert werden. Abbildung 3.30 stellt exemplarisch das Ergebnis eines solchen Filterassays dar.

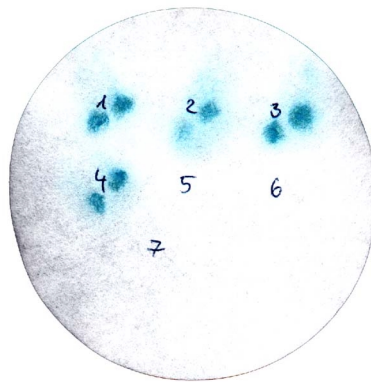


Abb. 3.30: Interaktion der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der β -Galactosidase Reporterogenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945

S. cerevisiae CG1945 transformiert mit **1** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-GRP, **2** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-GRP, **3** = pAS2-1(BD)-GRP + pACT2(AD)-hIGK, **4** = pAS2-1(BD)-GRP + pACT2(AD)-hLGK, **5** = pAS2-1(BD)-GRP + pACT2(AD)-GRP, **6** = pAS2-1(BD)-hIGK + pACT2(AD)-hIGK, **7** = pAS2-1(BD)-hLGK + pACT2(AD)-hLGK. Frische Hefezellklone wurden auf Filterpapier übertragen und die Hefezellen durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff aufgebrochen. Anschließend wurde das Filterpapier in eine Petrischale auf ein gleichartiges X-gal/Z-Puffer getränktes Filterpapier gelegt und die Petrischale 8 h bei 30 °C inkubiert. Blaue Klone zeigen β -Galactosidase Reporterogenaktivität an.

Alle aufgrund einer *HIS3*-Reporterogenaktivierung ermittelten Interaktionen konnten durch eine Aktivierung des *lacZ*-Reportergens im β -Galaktosidase Filterassay bestätigt werden. Somit kann das durch *Two Hybrid* Experimente bestimmte Interaktionsverhalten der einzelnen Bindungspartner folgendermaßen zusammengefaßt werden.

| | | pACT2 mit Aktivierungsdomäne (AD) | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|-----------------------|
| | | hIGK | hLGK | GRP | PFK2 | Ki | F26P ₂ ase |
| pAS2-1 mit Bin- dungs- domäne (BD) | hIGK | – | – | ++ | + | – | + |
| | hLGK | – | – | ++ | + | – | + |
| | GRP | +++ | +++ | – | n.b. | n.b. | n.b. |
| | PFK2 | ++ | ++ | n.b. | ++++ | ++ | ++ |
| | Ki | – | – | n.b. | ++ | +++ | ++ |
| | F26P ₂ ase | ++ | ++ | n.b. | ++ | ++ | – |

Tab. 3.16: Übersicht über die *Two Hybrid* Interaktionen in kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945

++++ = Sehr starke Interaktion, +++ = Starke Interaktion, ++ = Interaktion, + = Schwache Interaktion, – = keine Interaktion, **n.b.** = nicht bestimmt.

Die Interaktionsstärke wurde durch die Wachstumseigenschaften der kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945 auf SD-L/T/His + 5 mM 3-AT-Agarplatten und die durch die Hefezellen induzierte Farbintensität im β -Galactosidase Filterassay ermittelt. Dabei wurde im *HIS3*-Reportergenassay auf Selektionsagarplatten sowohl die Wachstumsstärke als auch die Zeit bis zum Auftreten der Klone berücksichtigt. Die homophilen Interaktionen sind in der Tabelle grau unterlegt.

Die in Tabelle 3.16 vorgenommene Einteilung der Interaktionsstärke basiert auf der Wachstumsstärke der Hefezellen auf SD-L/T/His + 5 mM 3-AT-Agarplatten unter Berücksichtigung der Zeit bis zum Auftreten der Klone sowie der Intensität der Farbreaktion im Filterassay. Um neben dieser semiquantitativen Aussage eine Quantifizierung der Reportergenaktivierung vorzunehmen, wurde der *S. cerevisiae* Stamm Y190 zur Kotransformation der Fusionsproteine verwendet. Im Hefestamm CG1945 steht das β -Galaktosidasegen nur unter einem schwachen Aktivator, der eine Quantifizierung nicht zulässt. Die Ergebnisse des β -Galaktosidase Chemilumineszenzassays sind in Abbildung 3.31 und 3.32 dargestellt. Die Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne zeigte wie im Hefestamm CG1945 keine homophile Interaktion. Es konnte nur ein der Kontrollreaktion entsprechendes Niveau der *lacZ*-Reportergenaktivierung bestimmt werden. Im Vergleich zur Fructose-2,6-bisphosphatase wurde eine homophile Interaktion bei der 6-Phosphofructo-2-kinasedomäne mit einem 14fachen Anstieg und bei dem bifunktionellen Enzym PFK2 mit einem 30fachen Anstieg der spezifischen Aktivität ermittelt. Weiterhin konnte die Bindung zwischen der Glucokinase und der PFK2 mit

einem 6fachen und die Bindung zwischen der Glucokinase und dem Glucokinase-Regulatorprotein mit einem 20fachen Anstieg der spezifischen Aktivität quantifiziert werden. Somit zeigt die Glucokinase im *Two Hybrid* Experiment eine deutliche Interaktion zur PFK2, die allerdings schwächer ist als die Bindung an das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber.

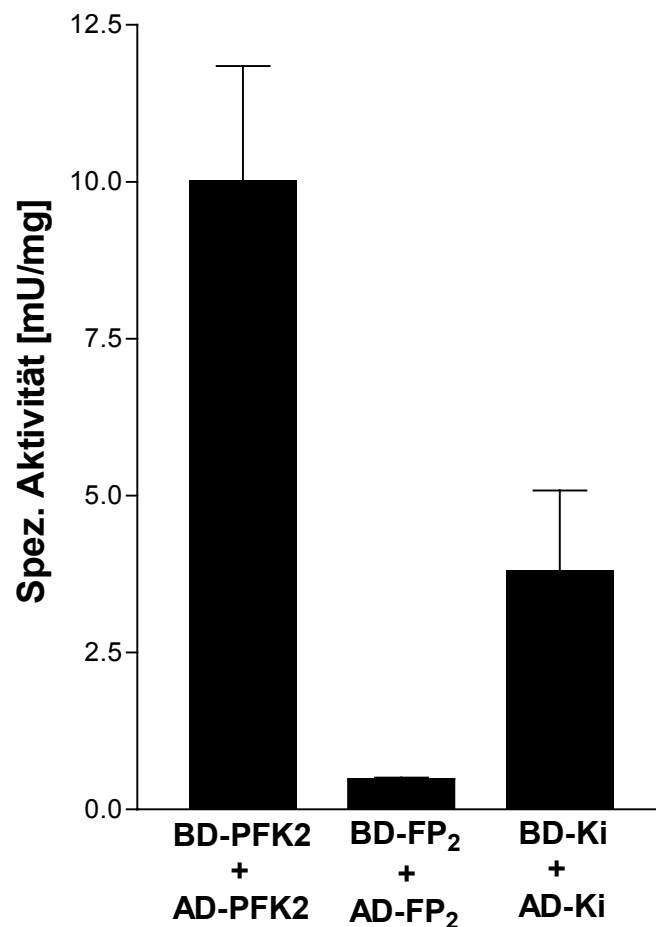


Abb. 3.31: Interaktion der PFK2, der Fructose-2,6-bisphosphatase und der 6-Phosphofructo-2-kinase im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der β -Galactosidase Reportergenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* Y190

Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 50 μ l des Aufschlusses wurden in einer Mikrotiterplatte mit 150 μ l GalactoStar Chemilumineszenz Reaktionspuffer (Tropix) versetzt und 20 min inkubiert. Anschließend wurden die RLU mit dem Luminometer aufgezeichnet und daraus die spezifische Aktivität in mU/mg Protein bestimmt.

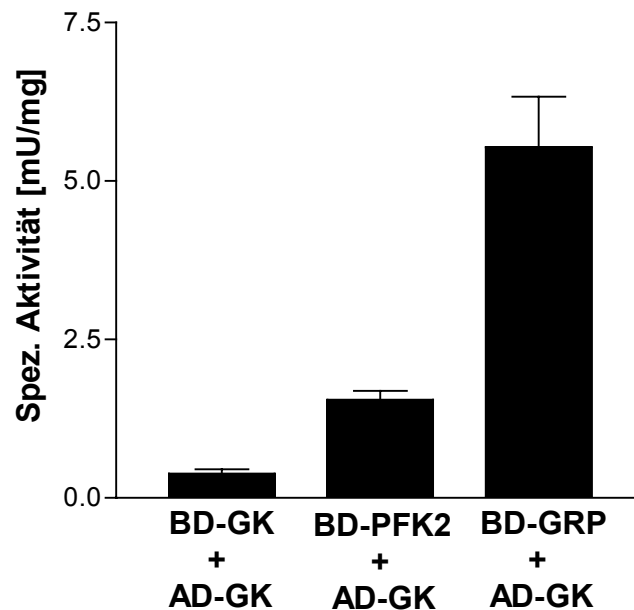


Abb. 3.32: Interaktion der Glucokinase, des Glucokinase-Regulatorproteins und der PFK2 im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der β -Galactosidase Reporterogenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* Y190

Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 50 μ l des Aufschlusses wurden in einer Mikrotiterplatte mit 150 μ l GalactoStar Chemilumineszenz Reaktionspuffer (Tropix) versetzt und 20 min inkubiert. Anschließend wurden die RLU mit dem Luminometer aufgezeichnet und daraus die spezifische Aktivität in mU/mg Protein bestimmt.

3.6 Charakterisierung der für die Glucokinasebindung entscheidenden Aminosäuren im GRP-Protein

Die Bindung des Glucokinase-Regulatorproteins an die Glucokinase konnte durch das durchgeführte *Phage Display Library Screening* mit dem GRP-Aminosäuremotiv $^{181}\text{Leucin-Serin-Alanin}^{183-186}\text{Valin-Alanin-Glycin}^{188}$ charakterisiert werden. Um die Bedeutung dieser Aminosäuren in der GK-GRP-Interaktion funktionell zu belegen, wurden sechs Mutanten generiert und die Effekte der Mutationen im *Two Hybrid* System überprüft.

3.6.1 Sequenzspezifische Mutagenese von sechs Aminosäuren des GRP-Proteins

Nach Aufreinigung des durch PCR gewonnenen kodierenden 1,8 kb GRP-cDNA-Fragments wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Sma*I durchgeführt und die Fragmente jeweils mit dem linearisierten und dephosphorylierten

Mutagenesevektor pAlter ligiert. Der ligierte Vektor wurde in *E. coli* JM109 transformiert. Aus den ampicillinresistenten Bakterienklonen wurde durch Minipräparation das Plasmid isoliert. Mit Hilfe von Restriktionsschnittanalysen und Sequenzanalysen wurde die korrekte Subklonierung in positiven Klonen überprüft. Nach der Subklonierung lagen die komplementären Bereiche für die Oligonukleotide des Antibiotikaresistenzwechsels (Amp^s , Tet^r) sowie für die Mutations-Oligonukleotide auf dem gleichen Einzelstrang des Vektors pAlter-1-GRP. Die Einzelstränge des pAlter-1-GRP-Vektors zur Initiierung der Mutagenesepezodur wurden durch Einzelstrangausschleusung mit Hilfe von Helferphagen erzeugt. Nach der Mutagenesepezodur erfolgte die Vorselektionierung auf $\text{Amp}^r\text{-Tet}^s$ -Klone durch einen kombinierten Ausstrich der erhaltenen Amp^r -Klone auf Ampicillin- und Tetracyclin-LB-Agarplatten. Durch ein Gitterraster war eine exakte Zuordnung der Antibiotikaresistenzen möglich (Abbildung 3.33). Hierbei wurde vorausgesetzt, daß bei einer erfolgreichen Bindung von zwei Mutations-Oligonukleotiden (*Ampicillin Repair und Tetracyclin Knockout*) ein drittes, das GRP-Mutations-Oligonukleotid ebenfalls erfolgreich bindet.

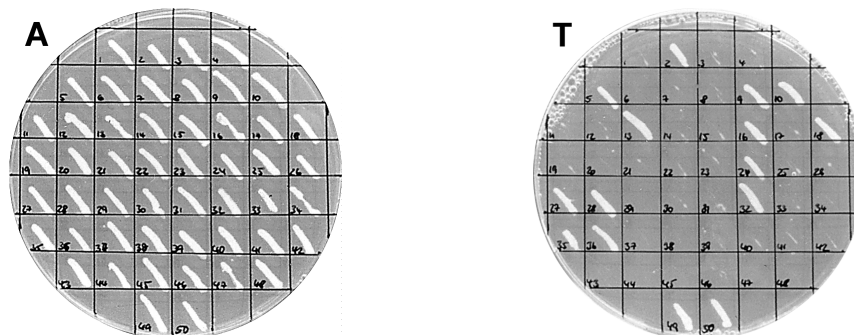


Abb. 3.33: Identifikation von $\text{Amp}^r\text{-Tet}^s$ JM109 pAlter-1-GRP-Mut Bakterienklonen durch kombinierten Ausstrich auf ampicillin- und tetracyclinhaltigen LB-Agarplatten

A = ampicillinhaltige Agarplatte, **T** = tetracyclinhaltige Agarplatte. Nach der Transformation des mutierten pAlter-GRP-Hybriddoppelstrangs in *E. coli* ES1301mutS wurden diese in ampicillinhaltigen SOC-Medium vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid pAlter-1-GRP isoliert, in *E. coli* JM109 transformiert und auf ampicillinhaltigem LB-Agar ausplattiert. Die ampicillinresistenten Klone wurden parallel auf die Ampicillin- und Tetracyclin-LB-Agarrasterplatten übertragen, um Klone mit einer Doppelmutation (Amp^r , Tet^r) zu identifizieren.

Die Effizienz des Antibiotikaresistenzwechsels lag zwischen 32 und 68 % (Tabelle 3.17). Durch Sequenzanalyse von $\text{Amp}^r\text{-Tet}^s$ -pAlter-1-GRP-Klonen der Mutation 1 – 6 wurden

positive Mutanten identifiziert. Ausschnitte aus der Sequenzanalyse der cDNA Fragmente der GRP Mutanten 1 – 6 in pAlter-1 sind in Abbildung 3.34 – 3.39 dokumentiert.

| GRP-Mutation | Amp ^r -Tet ^s -Resistenzwechsel |
|-----------------|--|
| 1 | 32% |
| 2 | 68% |
| 3 | 40% |
| 4 | 52% |
| 5 | 56% |
| 6 | 32% |
| Gesamteffizienz | 47% |

Tab. 3.17: Mutagenese Effizienzen für die Mutationen 1 – 6 des Glucokinase-Regulatorproteins

Die Effizienzen der Amp^r-Tet^s-Resistenzwechsel wurden durch Selektionsausstriche auf ampicillin- und tetracyclinhaltigen Agarplatten für jede Mutation ermittelt.

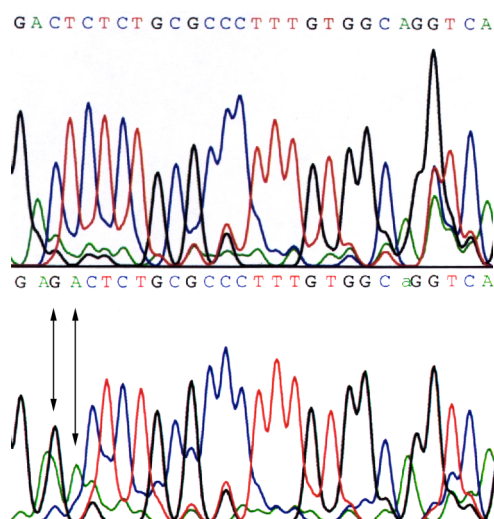


Abb. 3.34: Sequenzanalyse des GRP-Mutante 1-cDNA-Fragments des Vectors pAlter-GRPMut1

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Die veränderten Nukleotide sind durch Pfeile im Autoradiogramm gekennzeichnet. Das Leucin-Codon CTC wurde in GAC für Asparaginsäure geändert. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts.

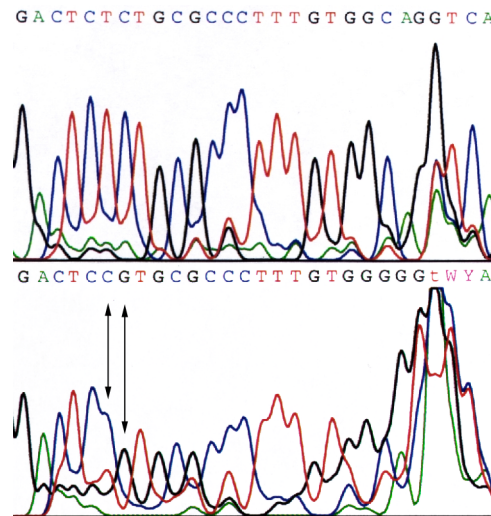


Abb. 3.35: Sequenzanalyse des GRP-Mutante 2-cDNA-Fragments des Vectors pAlter-GRPMut2

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Die veränderten Nukleotide sind durch Pfeile im Autoradiogramm gekennzeichnet. Das Serin-Codon TCT wurde in CGT für Arginin geändert. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts.

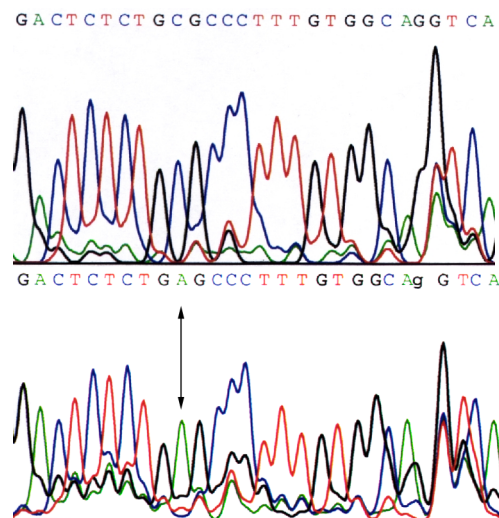


Abb. 3.36: Sequenzanalyse des GRP-Mutante 3-cDNA-Fragments des Vectors pAlter-GRPMut3

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Das veränderte Nukleotid ist durch einen Pfeil im Autoradiogramm gekennzeichnet. Das Alanin-Codon GCG wurde in GAG für Glutaminsäure geändert. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts.

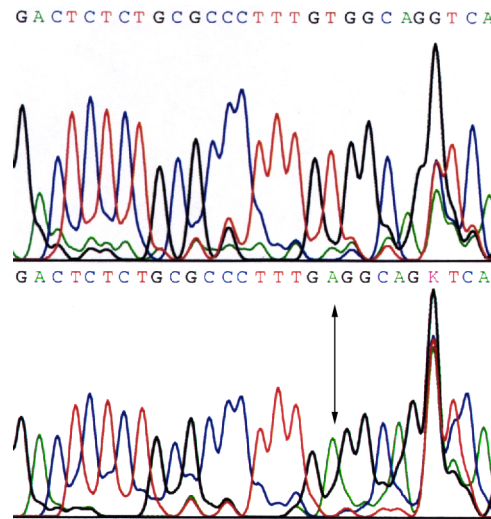


Abb. 3.37: Sequenzanalyse des GRP-Mutante 4-cDNA-Fragments des Vectors pAlter-GRPMut4

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Das veränderte Nukleotid ist durch einen Pfeil im Autoradiogramm gekennzeichnet. Das Valin-Codon GTG wurde in GAG für Glutaminsäure geändert. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts.

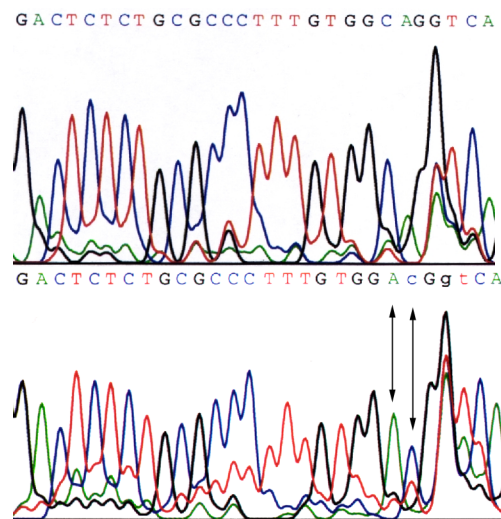


Abb. 3.38: Sequenzanalyse des GRP-Mutante 5-cDNA-Fragments des Vectors pAlter-GRPMut5

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Die veränderten Nukleotide sind durch Pfeile im Autoradiogramm gekennzeichnet. Das Alanin-Codon GCA wurde in GAC für Asparaginsäure geändert. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts.

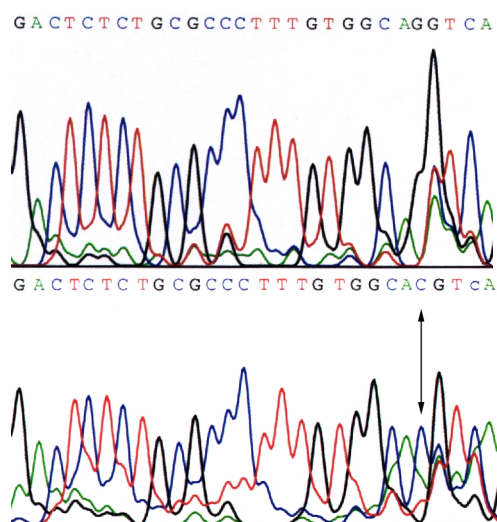


Abb. 3.39: Sequenzanalyse des GRP-Mutante 6-cDNA-Fragments des Vectors pAlter-GRPMut6

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Das veränderte Nukleotid ist durch einen Pfeil im Autoradiogramm gekennzeichnet. Das Glycin-Codon GGT wurde in CGT für Arginin geändert. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts.

Die jeweils mutierte Aminosäure der GRP Bindungsregion in den einzelnen Mutanten ist in Tabelle 3.18 im Vergleich zum Wildtyp zusammengefaßt.

| GRP | 181 | L | S | A | PF | V | A | G | 188 |
|-----------|-----|---|---|---|----|---|---|---|-----|
| GRP Mut 1 | 181 | D | S | A | PF | V | A | G | 188 |
| GRP Mut 2 | 181 | L | R | A | PF | V | A | G | 188 |
| GRP Mut 3 | 181 | L | S | E | PF | V | A | G | 188 |
| GRP Mut 4 | 181 | L | S | A | PF | E | A | G | 188 |
| GRP Mut 5 | 181 | L | S | A | PF | V | D | G | 188 |
| GRP Mut 6 | 181 | L | S | A | PF | V | A | R | 188 |

Aminosäuresequenz des Glucokinase-Regulatorproteins

Tab. 3.18: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des Glucokinase-Regulatorproteins und der Mutanten 1 – 6 des Glucokinase-Regulatorproteins

Es wurden hierbei aliphatische Aminosäuren (Leucin, Valin, Alanin) gegen saure Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) ausgetauscht sowie die neutrale

Aminosäure Serin gegen das basische Arginin. Zusätzlich wurden kurzkettige Aminosäuren (Glycin, Serin) durch das langkettige Arginin ersetzt. Durch diese Strategie sollte eine Veränderung der räumlichen bzw. elektrostatischen Bindungseigenschaften der GRP Domäne nach den biophysikalischen Regeln der Proteininteraktion erreicht werden.

Die Plasmide pAlter-1-GRP-Mutante1 – 6 dienten als *Template* zur PCR-Synthese der 1,8 kb GRP-Mut1 - 6-cDNA Fragmente (Abbildung 3.40). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *NcoI* und *EcoRI* durchgeführt. Die Fragmente wurden mit dem linearisierten und dephosphorylierten Vektor pAS2-1 ligiert. Der ligierte Vektor wurde in *E. coli* JM109 transformiert. Aus den ampicillinresistenten Bakterienklonen wurde durch Minipräparation das Plasmid isoliert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und Sequenzanalysen wurde die korrekte Subklonierung in positiven Klonen überprüft.

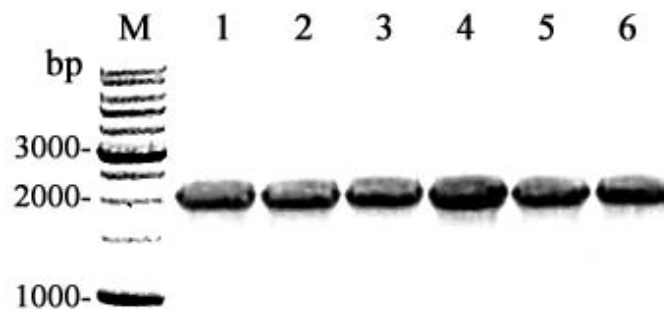


Abb. 3.40: PCR-Amplifikation des kodierenden Bereichs der Mutanten 1 - 6 des Glucokinase-Regulatorproteins mit *Composite* Primern

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igem TBE Agarosegel aufgetrennt. **M** = Molekulargewichtsstandard, **1 – 6** = Mutanten 1 – 6 des Glucokinase-Regulatorproteins. Die Amplifikation erfolgte über 25 Zyklen mit 100 ng pAlter-GRP-Mut1–6 Plasmid als *Template*. Durch Verwendung von *Composite*-Primern wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *NcoI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt. Die PCR-Produkte konnten direkt zur Klonierung in den Vektor pAS2-1 verwendet werden.

3.6.2 Charakterisierung der GRP-Mutanten durch Bindung an die Glucokinase im *Two Hybrid* System

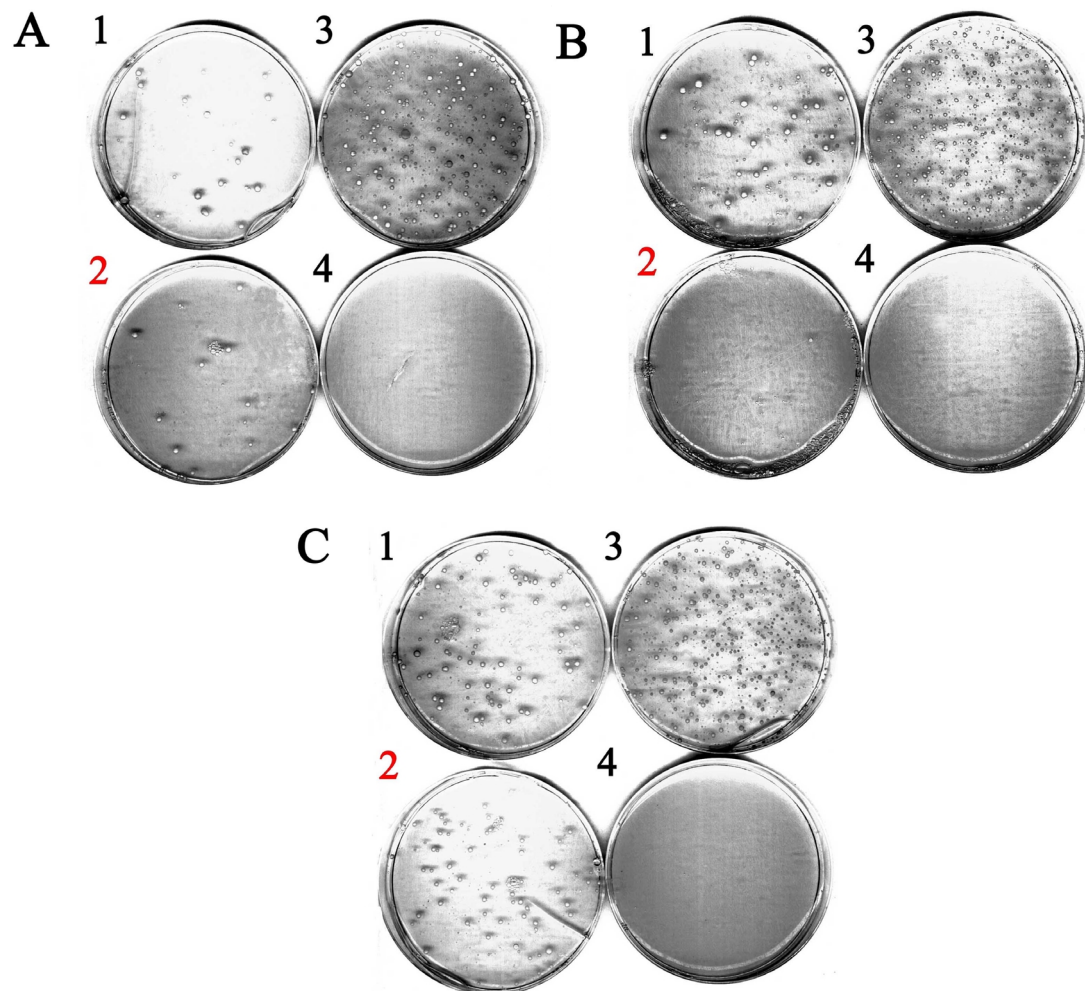


Abb. 3.41: Interaktion der Glucokinase mit den GRP Mutanten 1 – 3 im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reporterogenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945

SD-L/T (1,3) = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His (2,4)** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. Es wurden jeweils 100 µl der bei der Transformation erhaltenen Hefesuspension mit Hilfe von Glaskugeln auf die Agarplatte aufgebracht und diese für fünf Tage bei 30 °C inkubiert.

- A 1,2** = Transformation mit pACT2(AD)-GK und pAS2-1(BD)-GRP Mut1
- 3,4** = Transformation mit pACT2(AD) und pAS2-1(BD)-GRP Mut1.
- B 1,2** = Transformation mit pACT2(AD)-GK und pAS2-1(BD)-GRP Mut2
- 3,4** = Transformation mit pACT2(AD) und pAS2-1(BD)-GRP Mut2.
- C 1,2** = Transformation mit pACT2(AD)-GK und pAS2-1(BD)-GRP Mut3
- 3,4** = Transformation mit pACT2(AD) und pAS2-1(BD)-GRP Mut3.

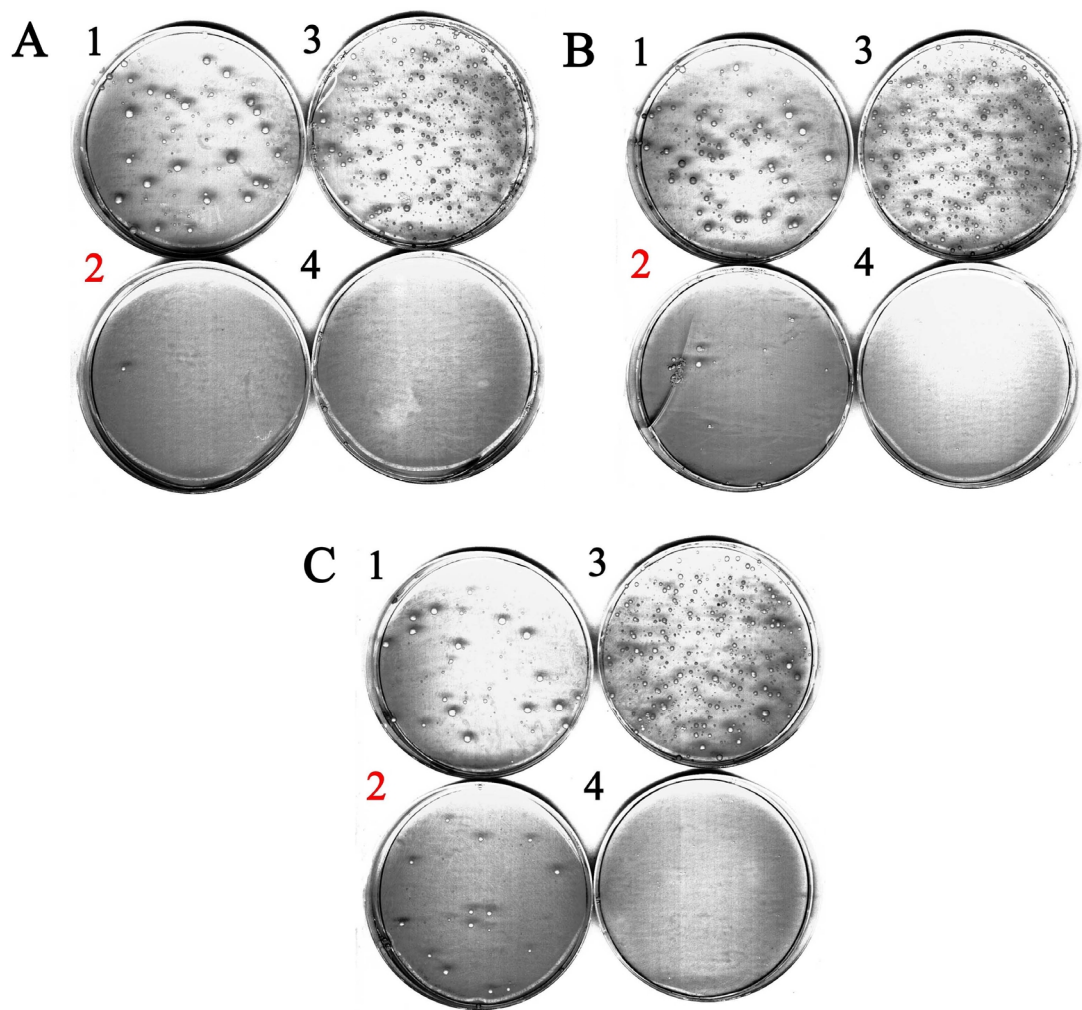


Abb. 3.42: Interaktion der Glucokinase mit den GRP Mutanten 4 – 6 im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der *HIS3* Reportergenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* CG1945

SD-L/T (1,3) = Selektionsagar ohne Leucin und Tryptophan ermöglicht nur das Wachstum von mit den Vektoren pAS2-1(BD) und pACT2(AD) kotransformierten Hefezellen. **SD-L/T/His (2,4)** = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. Es wurden jeweils 100 µl der bei der Transformation erhaltenen Hefesuspension mit Hilfe von Glaskugeln auf die Agarplatte aufgebracht und diese für fünf Tage bei 30 °C inkubiert.

- A 1,2** = Transformation mit pACT2(AD)-GK und pAS2-1(BD)-GRP Mut4
- 3,4** = Transformation mit pACT2(AD) und pAS2-1(BD)-GRP Mut4.
- B 1,2** = Transformation mit pACT2(AD)-GK und pAS2-1(BD)-GRP Mut5
- 3,4** = Transformation mit pACT2(AD) und pAS2-1(BD)-GRP Mut5.
- C 1,2** = Transformation mit pACT2(AD)-GK und pAS2-1(BD)-GRP Mut6
- 3,4** = Transformation mit pACT2(AD) und pAS2-1(BD)-GRP Mut6.

Zellen des *S. cerevisiae* Stammes CG1945 wurden paarweise mit dem Vektor pACT2(AD)-hIGK und einem der Vektoren pAS2-1(BD)-GRPMut1 – 6 kotransformiert und gleiche Volumina der Ansätze sowohl auf SD-L/T-Agarplatten als auch auf SD-L/T/His + 5mM 3AT-Agarplatten aufgebracht. Um auszuschließen, daß die BD-GRPMut1 – 6 Fusionsproteine alleine eine Reportergenaktivierung hervorrufen, wurde gleichzeitig nur der Vektor pACT2(AD) paarweise mit einem der Vektoren pAS2-1(BD)-GRPMut1 – 6 kotransformiert. Nach etwa fünf Tagen waren Kolonien auf den Agarplatten detektierbar. Die repräsentativen Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 3.41 - 3.42 dargestellt. Einzelne Kolonien der SD-L/T-Agarplatten wurden jeweils in Flüssigmedium amplifiziert und zur Proteinpräparation verwendet. *Western Blot*-Analysen der Proteinpräparationen mit GAL4 AD (Abbildung 3.43) und GAL4 DNA-BD (Abbildung 3.44) monoklonalem Antikörper zeigten eine korrekte Expression der Fusionsproteine.

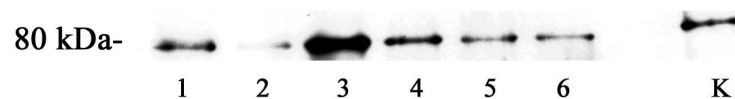


Abb. 3.43: *Western Blot*-Analysen des Fusionsproteins Aktivierungsdomäne-Glucokinase aus transformierten *S. cerevisiae* CG1945

1 – 6 = *S. cerevisiae* CG1945 kotransformiert mit den Plasmiden pAS2-1(BD)-GRP-Mut1 – 6 und pACT2(AD)-GK, K = *S. cerevisiae* CG1945 kotransformiert mit den Plasmiden pAS2-1(BD)-GRP-Wildtyp und pACT2(AD)-GK. Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 20 µl des Aufschlusses wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit dem GAL4 AD monoklonalen Antikörper und dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG der Ziege wurde das Aktivierungsdomäne-Glucokinase-Fusionsprotein durch Chemilumineszenz detektiert.

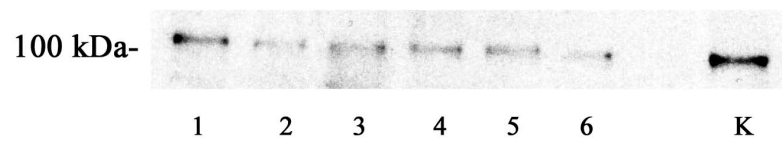


Abb. 3.44: Western Blot-Analysen des Fusionsproteins Bindungsdomäne-Glucokinase-Regulatorprotein Mutante 1 – 6 aus transformierten *S. cerevisiae* CG1945

1-6 = *S. cerevisiae* CG1945 kotransformiert mit den Plasmiden pAS2-1(BD)-GRP-Mut1 – 6 und pACT2(AD)-GK, **K** = *S. cerevisiae* CG1945 kotransformiert mit den Plasmiden pAS2-1(BD)-GRP-Wildtyp und pACT2(AD)-GK. Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 20 µl des Aufschlusses wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit dem GAL4 DNA-BD monoklonalen Antikörper und dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG der Ziege wurde das Bindungsdomäne-Glucokinase-Regulatorprotein-Fusionsprotein durch Chemilumineszenz detektiert.

Die Expression der BD-GRPMut1 – 6 Fusionsproteine mit dem AD Protein alleine im Kontrollexperiment führte nicht zu einer *HIS3*-Reportergenaktivierung. Durch Hefezellwachstum auf SD-L/T/His + 5mM 3AT-Agarplatten konnte eine Interaktion zwischen der Glucokinase und der GRP Mutante 1, 3 und 6 detektiert werden. Bei der GRP Mutante 2, 4 und 5 wurde im Gegensatz hierzu keine Bindung an die Glucokinase im *Two Hybrid* Experiment festgestellt. Somit sind die Aminosäuren Ser-182, Val-186 sowie Ala-187 für die Interaktion des GRP mit der Glucokinase von entscheidender Bedeutung. Die Bindung scheint wesentlich durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt zu werden, da die Mutation aliphatischer Residuen in geladene Seitenketten einen Verlust der Interaktion zur Folge hatte. Um eine Aussage über die Bindung der GRP Mutante 1, 3 und 6 an die Glucokinase im Vergleich zum Wildtyp-GRP zu machen, wurde die Reportergenaktivierung quantifiziert. Hierzu wurde der *S. cerevisiae* Stamm Y190 in gleicher Weise wie CG1945 kotransformiert. Die Bestimmung der β -Galaktosidase Reportergenaktivierung in *S. cerevisiae* Y190 ist in Abbildung 3.45 dargestellt. Es zeigte sich hierbei, daß die Mutation der Aminosäuren Ser-182, Val-186 und Ala-187 zu einem kompletten Verlust der GRP-GK Interaktion führte. Im β -Galaktosidaseassay konnte nur ein der Kontrollreaktion entsprechendes Niveau der *lacZ*-Reportergenaktivierung bestimmt werden. Im Vergleich zum Wildtyp GRP wurde bei den GRP Mutanten 1, 3 und 6 eine Abnahme der spezifischen Aktivität von 45 – 65 % im β -Galaktosidase Reportergenassay detektiert. Somit führte die Mutation der Aminosäuren Leu-181, Ala-183 und Gly-188

ebenfalls zu einem Einfluß auf das Bindungsverhalten des GRP zur GK. Durch diese *Two Hybrid* Experimente konnte gezeigt werden, daß die Aminosäuresequenz ¹⁸¹Leucin-Serin-Alanin¹⁸³⁻¹⁸⁶Valin-Alanin-Glycin¹⁸⁸ des Glucokinase-Regulatorproteins unter dem primären Einfluß der Residuen Ser-182, Val-186 und Ala-187 die Bindung zur Glucokinase vermittelt.

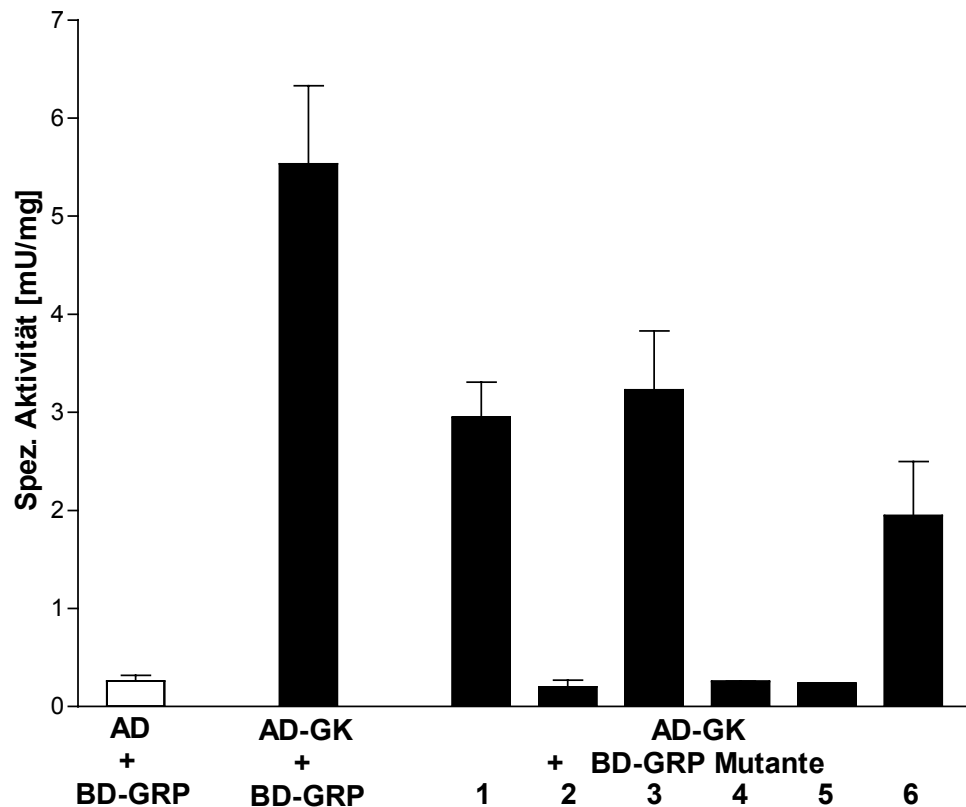


Abb. 3.45: Interaktion der Glucokinase mit den GRP Mutanten 1 – 6 im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der β -Galactosidase Reportergenaktivität in kotransformierten *S. cerevisiae* Y190

Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 50 μ l des Aufschlusses wurden in einer Mikrotiterplatte mit 150 μ l GalactoStar Chemilumineszenz Reaktionspuffer (Tropix) versetzt und 20 min inkubiert. Anschließend wurden die RLU mit dem Luminometer aufgezeichnet und daraus die spezifische Aktivität in mU/mg Protein bestimmt.

3.7 Identifizierung von Glucokinase bindenden Proteinen der Leber mit Hilfe des Two Hybrid Library Screening

Für die Glucokinase konnten in der Leber Translokationsprozesse als wesentlicher Regulationsmechanismus gezeigt werden, die Bindungspartner im Einzelnen aber noch nicht bestimmt werden. Dabei gliedert sich das Glucokinase-Regulatorprotein in dieses Konzept ein, da nur in dessen Anwesenheit eine Konzentrierung der Glucokinase im Nukleus erfolgt. Das Prinzip dieser Regulation konnte auch an COS-1- und HeLa-Zellen gezeigt werden, in denen die GK und das GRP als Fusionsproteine mit dem GFP bzw. BFP (*Green/Blue Fluorescent Protein*) überexprimiert wurden und die Lokalisation mittels Konfokaler Laser Mikroskopie bestimmt werden konnte (de la Iglesia *et al.* 1999). Mit der Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern der Glucokinase in der Leber eröffnet sich gleichzeitig auch die Möglichkeit, daß diese Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation der Glucokinaseenzymaktivität in der β -Zelle des Pankreas übernehmen. Durch direkte *Two Hybrid* Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß das BD-Glucokinase Fusionsprotein in *S. cerevisiae* korrekt exprimiert wird und mit dem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber interagiert. In diesem System ist nun nicht nur eine Detektion von Interaktionen bekannter Proteine möglich, sondern auch die Identifizierung von neuen Bindungspartnern eines Proteins durch Verwendung einer pACT2-cDNA-Datenbank. Daher war es das Ziel der folgenden Untersuchung, Glucokinase Interaktionspartner der Leber durch das Screening der *Rat Liver MATCHMAKER cDNA Library* zu isolieren und zu charakterisieren.

3.7.1 Isolierung von Glucokinase bindenden Proteinen aus einer *Rat Liver* MATCHMAKER cDNA Library

Verwendet wurde die *Rat Liver MATCHMAKER cDNA Library*, die mit einer Variabilität von $3,5 \times 10^6$ verschiedenen pACT2-Klonen in *E. coli* BNN132 von Clontech bezogen wurde. Der Titer der *Library* wurde mit 2×10^8 cfu/ml bestimmt. Die *Library* wurde auf Festmedium amplifiziert und anschließend die Plasmid-DNA in einer Maxipräparation isoliert. Zellen aus einer 1 l Kultur des Hefestammes *S. cerevisiae* CG1945 wurden nach dem 2:1 Libraryansatz von BD-Vektor zu AD-Vektor mit 1 mg pAS2-1(BD)-hIGK-Plasmid und 0,5 mg pACT2(AD)-Library-Plasmid kotransformiert und auf 50 quadratische 12 cm große SD-L/T/His + 5mM 3AT-Agarplatten aufgebracht. Die Anzahl der

analysierten Libraryklone konnte mit Hilfe von SD-L/T-Agarplatten auf 1×10^6 bestimmt werden. Nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen konnten 13 Klone von den Selektionsagarplatten isoliert werden. Die Kolonien wurden in Flüssigmedium amplifiziert und die Kulturen zum Anlegen einer Erhaltungskultur und zur Proteinpräparation verwendet. Um falsch positive Klone auszuschließen, die aufgrund einer eigenständigen Aktivierung des *HIS3*-Reportergens durch das Libraryinsert wachsen, wurde die β -Galaktosidase Reportergenaktivierung überprüft. In Abbildung 3.46 sind die Ergebnisse des Chemilumineszenzassays unter Verwendung des *GalactoStar* Substrats dargestellt. Die erhaltenen Werte sind semiquantitativ, da im Hefestamm CG1945 das β -Galaktosidasegen nur unter einem schwachen Aktivator steht. Damit konnten die Klone 1, 2, 8, 9, 10 und 12 als positive Klone identifiziert werden, bei denen das kodierende Protein des Library-cDNA Inserts mit der Glucokinase interagiert.

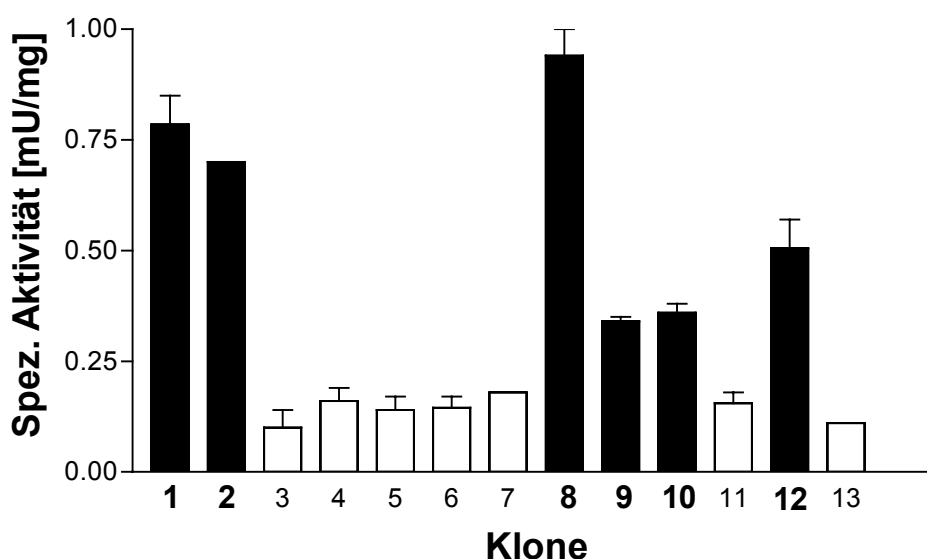


Abb. 3.46: Interaktion der Glucokinase mit Proteinen der *Rat Liver* MATCHMAKER Library im *Two Hybrid* Experiment: Bestimmung der β -Galaktosidase Reportergenaktivität in isolierten *S. cerevisiae* CG1945 Hefeklonen 1 – 13 der Librarytransformation

Die isolierten Hefeklone 1 – 13 wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 50 μ l des Aufschlusses wurden in einer Mikrotiterplatte mit 150 μ l *GalactoStar* Chemilumineszenz Reaktionspuffer (Tropix) versetzt und 20 min inkubiert. Anschließend wurden die RLU mit dem Luminometer aufgezeichnet und daraus die spezifische Aktivität in mU/mg Protein bestimmt.

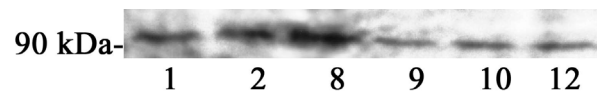


Abb. 3.47: Western Blot-Analysen der Aktivierungsdomäne-Fusionsproteine aus isolierten Hefeklonen der Librarytransformation

1, 2, 8, 9, 10, 12 = isolierte *S. cerevisiae* CG1945 Hefeklone der Librarytransformation. Die transformierten Hefen wurden in Flüssigmedium amplifiziert, das erhaltene Zellpellet in Z-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von *Glass Beads* aufgeschlossen. 20 µl des Aufschlusses wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Inkubation mit dem GAL4 AD monoklonalen Antikörper und dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG der Ziege wurde das Aktivierungsdomäne-Libraryprotein durch Chemilumineszenz detektiert.

Um die Expression der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden jeweils *Western Blot*-Analysen der Proteinpräparationen mit GAL4 DNA-BD (Daten nicht abgebildet) und GAL4 AD monoklonalem Antikörper durchgeführt. Es zeigte sich, daß alle sechs positiven Klone ein etwa 90 kDa großes AD-Fusionsprotein exprimierten (Abbildung 3.47). Um die Vitalität der positiven Klone zu überprüfen, wurden 10 µl der Erhaltungskultur auf SD-L/T/His + 5mM 3AT-Agarplatten ausgestrichen und für fünf Tage inkubiert. Alle Klone wuchsen erneut auf (Abbildung 3.48).

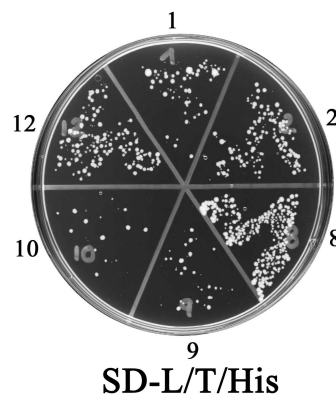


Abb. 3.48: Interaktion der Glucokinase mit Proteinen der *Rat Liver* MATCHMAKER Library im *Two Hybrid* Experiment: Überprüfung der *HIS3* Reportergenaktivität in den *S. cerevisiae* CG1945 Klonen 1, 2, 8, 9, 10 und 12

SD-L/T/His = Selektionsagar ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und einem Zusatz von 5 mM 3-AT ermöglicht nur das Wachstum von Hefezellen, in denen es zur Interaktion der durch die Vektoren codierten Fusionsproteine kommt. Es wurden jeweils etwa 10 µl der bei -70 °C gelagerten Erhaltungskultur mit einer Impföse auf der Agarplatte ausgestrichen und diese für fünf Tage inkubiert. 1, 2, 8, 9, 10, 12 = isolierte Hefeklone der Librarytransformation.

3.7.2 Charakterisierung der positiven Klone des *Libraryscreenings*

Nach Isolierung der pACT2-Library-Plasmid-DNA der sechs positiven Klone wurde diese zur Sequenzanalyse verwendet. In Abbildung 3.49 ist exemplarisch die Sequenzanalyse des pACT2-cDNA-Fragments aus Klon 10 dargestellt.

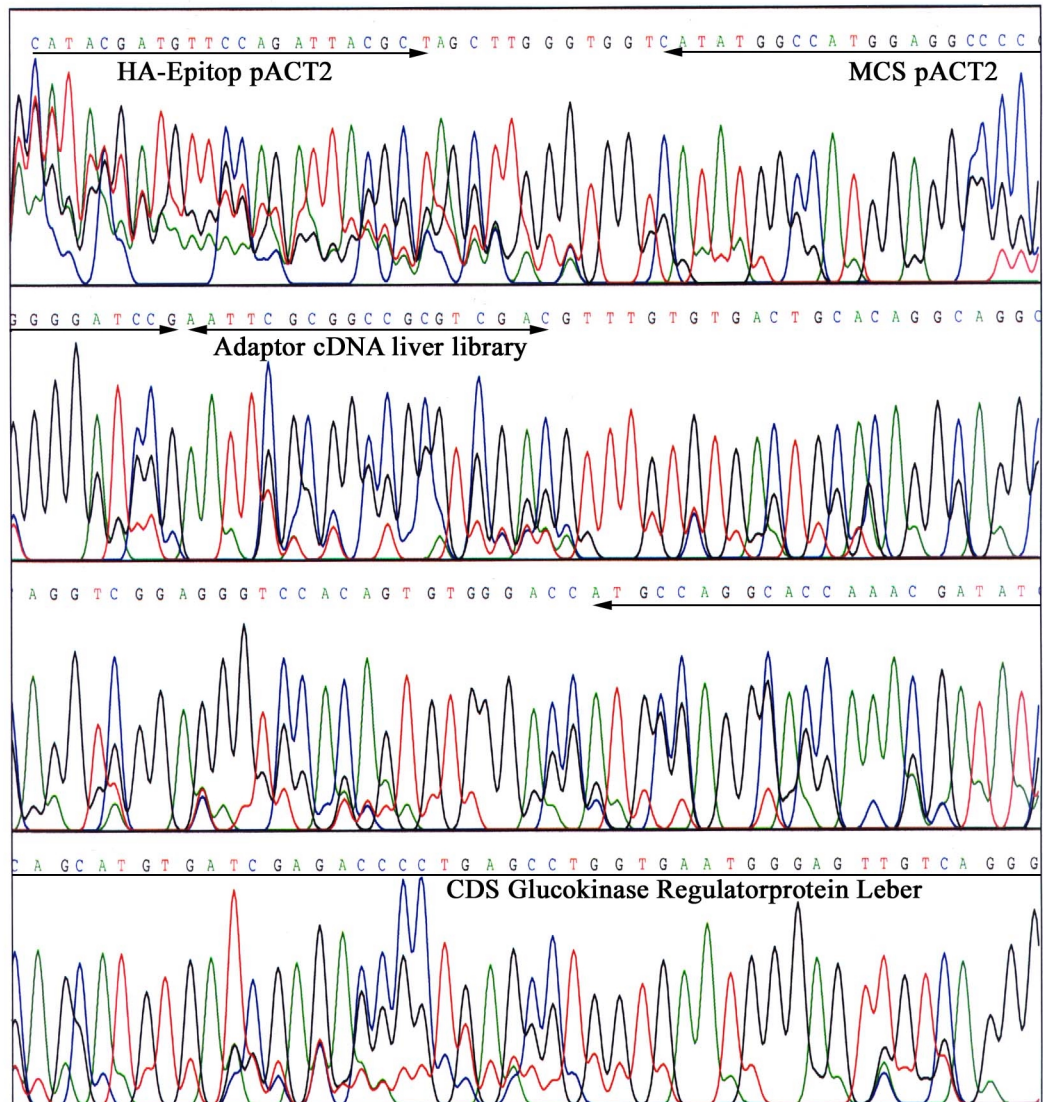


Abb. 3.49: Sequenzanalyse des pACT2-cDNA-Fragments aus dem isolierten *S. cerevisiae* CG1945 Hefeklon 10 der *Librarytransformation*

Die Sequenzanalyse wurde nach der *Taq-cycle-sequencing* Methode durchgeführt. Die 5'-3' Leserichtung erfolgt von links nach rechts. Durch Pfeile ist ein Teil des HA-Epitops im Vektor pACT2, die MCS des Vektors mit anschließendem Adaptor der *rat liver library* und das *Insert*, welches sich als cDNA des Glucokinase-Regulatorproteins identifizieren ließ, gekennzeichnet.

In allen Klonen konnte das gleiche Insert identifiziert werden. Durch Datenbankanalyse wurde das Insert dem Glucokinase-Regulatorprotein der Rattenleber zugeordnet (*Database Accession No*: Q07071), wobei zwischen dem kodierenden 1,8 kb GRP-cDNA-Fragment und der Aktivierungsdomäne ein nichtkodierendes 51 Basenpaarfragment des GRP vorliegt. Dies erklärt auch, weshalb im *Western Blot* alle AD-Fusionsproteine der positiven Klone eine Größe von 90 kDa aufwiesen. Dies entspricht dem Molekulargewicht des GRP als Fusionsprotein mit der GAL4-Aktivierungsdomäne. Somit konnte aus der *Two Hybrid Library* der Leber nur das Glucokinase-Regulatorprotein als Bindungspartner der Glucokinase identifiziert werden. Die durch die *Rat Liver cDNA Library* vermittelte Genexpressionshäufigkeit von mRNA Spezies liefert einen ungefähren Anhaltspunkt für die Proteinexpression in der Leber. Da unter diesen Bedingungen keine weiteren Interaktionspartner der Glucokinase ermittelt werden konnten, ist anzunehmen, daß das GRP der bestimmende lösliche Proteinfaktor für die Glucokinaseregulation in der Leber ist.

3.8 Identifizierung von Glucokinase-Regulatorprotein bindenden Peptiden mit Hilfe des "Phage Display" Systems

Durch das *Phage Display* Library Screening konnte die Bindungsdomäne im Glucokinase-Regulatorprotein lokalisiert werden, auf die die Interaktion zur Glucokinase beruht. Mit Hilfe von Mutationen und anschließenden *Two Hybrid* Bindungsstudien wurde diese Domäne funktionell charakterisiert. Welche Domänen im Glucokinaseprotein für die GK-GRP-Interaktion entscheidend sind, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Mit dem aufgereinigten rekombinanten Glucokinase-Regulatorprotein aus *S. pombe* und der bereits verwendeten Ph.D.-12TM Bibliothek von New England Biolabs war es möglich, ein weiteres *Phage Display* Panningexperiment durchzuführen. Mit diesem Selektionsprozeß gegen das immobilisierte Glucokinase-Regulatorprotein wurden Aminosäuresequenzen im Glucokinasemolekül identifiziert, die zu einem genaueren Verständnis der GK-GRP-Bindung beitragen.

3.8.1 Isolierung von Glucokinase-Regulatorprotein Bindungspeptiden durch Panning

Da das rekombinante Glucokinase-Regulatorprotein in *S. pombe* nur in geringen Mengen synthetisiert werden konnte, war eine direkte Bindung des Proteins an eine feste Oberfläche

z.B. von MaxiSorb Mikrotiterplatten nicht möglich. An *Reacti-Bind Glutathione Coated Strips* können jedoch auch kleine Mengen von GST-Tag-Proteinen sehr effizient immobilisiert werden. Um zu überprüfen, ob das GRP gleichmäßig in den *Wells* der *Strips* präsentiert wird, wurden drei *Strips* über Nacht mit einem Überschuß an Protein inkubiert. Der anschließend durchgeführte ELISA mit Anti-GST Antikörper von der Ziege zeigte eine gleichmäßige Antigenbindung. Es wurden parallel zwei Panningexperimente durchgeführt, zum einen das Panning GRP-GST zur Selektion von spezifisch an das Glucokinase-Regulatorprotein bindende Phagen und andererseits das Panning GST als Kontrollpanning. Die Bedingungen beider Experimente sind in Tabelle 3.19 beschrieben.

| | Panning GST | Panning GRP-GST |
|--|--------------------------------------|--|
| Waschschritte: | 0,1 % Tween 20 niedrige Stringenz | 0,1 % Tween 20 niedrige Stringenz |
| Elution: | Glycin (pH2,2) | Glycin (pH2,2) |
| Bindung an Reacti-Bind Glutathione Coated Strips: | Glutathion-S-Transferase (GST) | GST-Tag-Glucokinase- Regulatorprotein |
| Phagentiter in pfu | 1. Panning: | 5×10^1 |
| | 2. Panning: | 1×10^2 |
| | 3. Panning: | 2×10^3 |

Tab. 3.19: Charakterisierung des Pannings GST und GRP-GST

Aufgrund der Antigenität der Glutathion-S-Transferase war die Durchführung des Panning GST notwendig. Durch den Vergleich konnte festgestellt werden, ob sich im Panning GRP-GST Phagen durch Bindung an den GST-Tag angereichert hatten. Die Peptidsequenzen der sequenzierten Phagenklone sind in den Tabellen 3.20 – 3.24 aufgeführt.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 2 | N | M | F | G | S | L | T | S | H | V | T | A |
| 2 | H | A | H | A | S | L | T | R | H | N | G | N |
| 2 | W | A | E | T | W | P | L | A | Q | R | P | P |
| 1 | Q | V | N | Q | W | S | P | L | V | N | I | R |
| 1 | H | L | K | P | L | Q | M | H | H | P | N | V |
| 1 | D | E | N | L | S | L | R | P | L | F | P | K |
| 1 | Q | A | E | N | K | I | D | V | H | L | P | I |
| 1 | K | L | T | N | I | L | Q | H | Q | P | M | A |
| 1 | N | T | H | S | I | P | T | F | L | H | S | S |
| 1 | F | P | D | H | W | A | L | D | R | L | I | M |
| 1 | Q | A | E | R | S | D | H | L | P | T | L | S |
| 1 | L | G | N | Q | G | L | S | L | T | L | R | L |
| 1 | S | Y | S | Q | H | Y | G | I | P | N | P | T |
| 1 | H | S | S | L | M | S | T | L | L | H | N | R |
| 1 | A | K | P | P | E | N | N | T | T | R | Q | S |
| 1 | T | S | G | F | L | H | P | P | R | T | M | E |
| 1 | S | T | I | I | Q | F | D | G | L | H | P | R |
| 1 | A | Q | S | G | L | L | R | P | P | S | R | A |
| 1 | A | T | T | R | F | I | L | F | P | E | T | A |
| 1 | S | I | F | F | E | H | A | P | R | Y | S | P |

Tab. 3.20: Peptidsequenzen der 23 sequenzierten Phagenklone im 2. Panning des Panning GRP-GST

Zur Übersicht ist die Aminosäure Asparagin (N) in rot und zusätzlich im Dodekapeptid vorhandene Leucinresiduen (L) in blau hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 3 | F | P | Y | K | S | G | P | S | V | A | P | P |
| 3 | H | W | D | P | F | S | L | S | A | Y | F | P |
| 1 | A | P | L | W | P | T | P | L | A | N | S | V |
| 1 | V | P | S | P | S | L | R | L | R | Q | S | S |
| 1 | N | Q | P | L | K | T | V | V | N | G | R | A |
| 1 | E | L | R | F | S | G | F | A | G | T | T | A |
| 1 | T | M | G | F | T | A | P | R | F | P | H | Y |
| 1 | T | I | A | Q | K | E | H | L | L | H | F | F |
| 1 | T | P | P | P | R | D | A | S | L | S | R | W |
| 1 | D | Q | R | V | L | P | S | T | F | A | G | D |
| 1 | T | P | L | E | T | S | S | R | S | L | P | R |
| 1 | D | A | L | S | V | H | G | V | V | V | P | H |
| 1 | T | I | T | P | K | I | A | S | L | R | P | E |
| 1 | Q | L | P | S | S | L | K | F | Q | P | V | A |
| 1 | T | P | S | V | L | S | T | A | L | H | S | S |

Tab. 3.21: Peptidsequenzen der 19 sequenzierten Phagenklone im 2. Panning des Panning GST

Im 2. Panning des Panningexperiments GRP-GST konnte im Vergleich zum Panningexperiment GST eine deutliche Anreicherung der Aminosäure Asparagin (N) festgestellt werden. Der Anteil von N an der Gesamtaminosäureverteilung betrug im GRP-GST Panning 5,8 % im Vergleich zu 1,3 % im GST Panning. Auch im Vergleich mit der im Panning K ermittelten Häufigkeit von 1,8 % ist ein deutlicher Anstieg der in Peptiden selten vertretenen Aminosäure zu sehen. Ferner ist das Auftreten der Aminosäure Leucin (L) im Abstand von einer oder vier Aminosäuren zu N auffällig. Dabei sind zusätzlich L-X-X-L und L-X-L Motive bevorzugt vertreten. Eine solche Häufung konnte bei den sequenzierten Klonen des 2. Pannings GST nicht festgestellt werden. Im 3. Panning des Pannings GRP-GST kam es ebenfalls zu einer Anreicherung der für das 2. Panning

beschriebenen Aminosäuremotive. Obwohl ein erhöhter Phagentiter bestimmt wurde, fand eine stärkere Selektion bindender Phagen als im 2. Panning nicht statt, wobei die geringe GST-Tag-GRP Menge als mögliche Ursache angesehen wurde. Der Anteil von **N** an der Gesamtaminosäureverteilung betrug im 3. Panning des GRP-GST Pannings 4,4 % im Vergleich zu konstanten 1,3 % im GST Panning.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 2 | Q | V | N | Q | W | S | P | L | V | N | I | R |
| 2 | N | M | F | G | S | L | T | S | H | V | T | A |
| 2 | Q | L | Y | N | N | R | S | L | F | P | A | W |
| 1 | T | I | I | T | R | P | L | A | L | L | A | V |
| 1 | S | P | T | S | V | A | T | N | S | P | P | R |
| 1 | D | R | A | P | L | I | P | F | A | S | Q | H |
| 1 | H | A | I | Y | L | S | P | R | L | D | V | F |
| 1 | F | G | S | S | M | K | A | R | P | E | T | P |
| 1 | Q | T | Q | A | L | Y | H | S | R | Q | V | H |
| 1 | F | P | G | E | H | P | P | F | P | F | A | K |
| 1 | W | S | F | S | T | D | D | S | S | S | P | T |
| 1 | L | P | T | K | Y | A | V | S | F | L | T | T |
| 1 | T | P | V | M | P | P | R | W | A | V | A | L |
| 1 | W | A | P | P | L | F | R | S | S | L | F | Y |
| 1 | W | A | E | T | W | P | L | A | Q | R | P | P |
| 1 | S | I | L | S | T | M | S | P | H | G | A | T |

Tab. 3.22: Peptidsequenzen der 19 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des Panning GRP-GST

Zur Übersicht ist die Aminosäure Asparagin (**N**) in **rot** und zusätzlich im Dodekapeptid vorhandene Leucinresiduen (**L**) in **blau** hervorgehoben.

| Anzahl der Klone | Position der Aminosäuren im Phagenpeptid | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 2 | T | M | G | F | T | A | P | R | F | P | H | Y |
| 2 | L | L | A | D | T | T | H | H | R | P | W | T |
| 1 | Y | T | S | G | Y | N | S | T | L | R | G | T |
| 1 | Y | L | N | Y | P | Y | P | S | S | T | L | G |
| 1 | A | Y | W | S | N | P | E | S | H | P | R | Q |
| 1 | S | A | H | G | T | S | T | W | C | S | W | P |
| 1 | S | T | L | H | M | I | L | P | P | R | L | S |
| 1 | V | P | Q | A | T | F | G | D | V | F | S | R |
| 1 | M | Q | E | K | Y | P | S | K | T | W | R | L |
| 1 | S | P | L | T | V | P | Y | E | R | K | L | L |
| 1 | W | G | H | D | L | M | Q | P | L | R | S | E |
| 1 | T | P | P | P | R | D | A | S | L | S | R | W |
| 1 | F | S | P | G | A | P | R | V | A | L | I | S |
| 1 | V | P | W | S | P | D | W | Y | S | T | V | R |
| 1 | W | P | Q | L | T | V | G | Q | E | H | R | T |
| 1 | T | I | A | Q | K | E | H | L | L | H | F | F |
| 1 | Y | P | H | Y | S | L | P | G | S | S | T | L |

Tab. 3.23: Peptidsequenzen der 19 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des Panning GST

3.8.2 Charakterisierung der Glucokinase-Regulatorprotein Bindungspeptide

Folgende drei Dodekapeptide haben sich sowohl im 2. Panning GRP-GST als auch im 3. Panning GRP-GST angereichert. Sie enthalten mindestens einmal die Aminosäure Asparagin (N) als auch die Aminosäure Leucin (L) in einer Differenz von einer bis vier Aminosäuren zu N, wobei eine deutliche Tendenz zum Abstand von vier Aminosäuren besteht.

Phagenpeptid A N M F G S L T S H V T A

Phagenpeptid B Q V N Q W S P L V N I R

Phagenpeptid C Q L Y N N R S L F P A W

Aus diesen Peptidsequenzen ließ sich das Konsensusmotiv N-X-X-X-X-L bzw. L-X-X-X-N formulieren. Durch systematische Analyse der Glucokinase Aminosäuresequenz konnten drei Motive identifiziert werden, in denen die Aminosäure Asparagin (N) und Leucin (L) in einer solchen vergleichbaren Differenz vertreten sind. Dabei wurde das analog zur Kristallstruktur der Hefehexokinase B entwickelte theoretische Modell (St. Charles *et al.* 1994) für die Glucokinase zugrundegelegt (Abbildung 3.50). Die im Modell markierten drei Positionen stellen potentielle Bindungssequenzen der Glucokinase in der Interaktion zum GRP dar. Die Position N350/L355 sowie die Position L309/N313 entsprachen dem Konsensusmotiv nicht nur in der Aminosäuresequenz, sondern zeigten jeweils auch eine enge räumliche Nähe in der Molekülstruktur. Beide Motive liegen im zweischenkeligen Glucokinasmolekül an der Spitze der größeren Domäne, leicht dem Winkellinneren zugewandt. Im Glucokinasmolekül konnten zwei NES (*Nuclear Export Signal*) lokalisiert werden (Shiota *et al.* 1999). Dabei ist die Aminosäure Leucin L355 Bestandteil des einen NES und die Aminosäure Leucin L309 Bestandteil des anderen NES. Somit konnten Bindungssequenzen identifiziert werden, die aufgrund der beschriebenen dualen Funktion für das Interaktionsverhalten des Glucokinaseproteins eine wesentliche Bedeutung besitzen. Darüber hinaus besteht eine sterische Nähe der Aminosäuren L58 und N204, die allerdings im Winkel beider Domänen und somit im katalytischen Zentrum der Glucokinase weniger zugänglich lokalisiert sind.

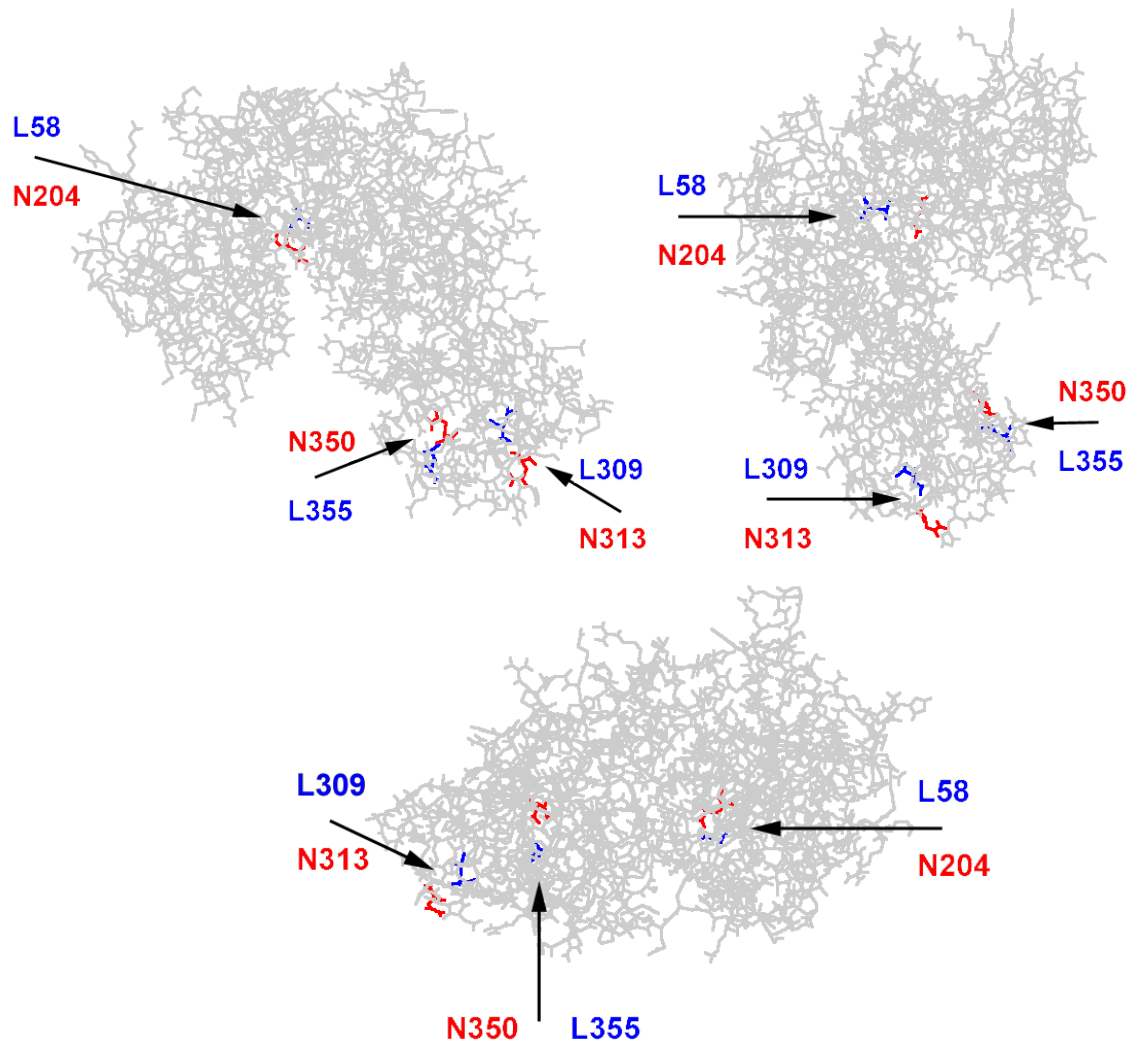


Abb. 3.50: Lokalisierung potentieller Bindungssequenzen der Glucokinase im dreidimensionalen Modell

Die Modellansicht der Glucokinase beruht auf dem analog zur Kristallstruktur der Hefehexokinase B entwickelten theoretische Modell (St. Charles *et al.* 1994). Die drei Abbildungen wurden mit dem Programm *Swiss PDB Viewer* erstellt. Die Angabe der Aminosäuren bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der humanen β -Zell Glucokinase (1-466).

Um die Bindung der drei konsensussequenztragenden Phagendodekapeptide A, B und C an das Glucokinase-Regulatorprotein zu bestätigen, wurden diese amplifiziert und auf GST-*Tag*-GRP gekoppelten *Reacti-Bind Glutathione Coated Strips* und zur Kontrolle auf mit GST gekoppelten *Strips* inkubiert. Dabei wurde eine Phagenkonzentration von 10^{14} Phagen pro *Well* eingesetzt. Gebundene Phagen wurden mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-M13 Antikörper detektiert.

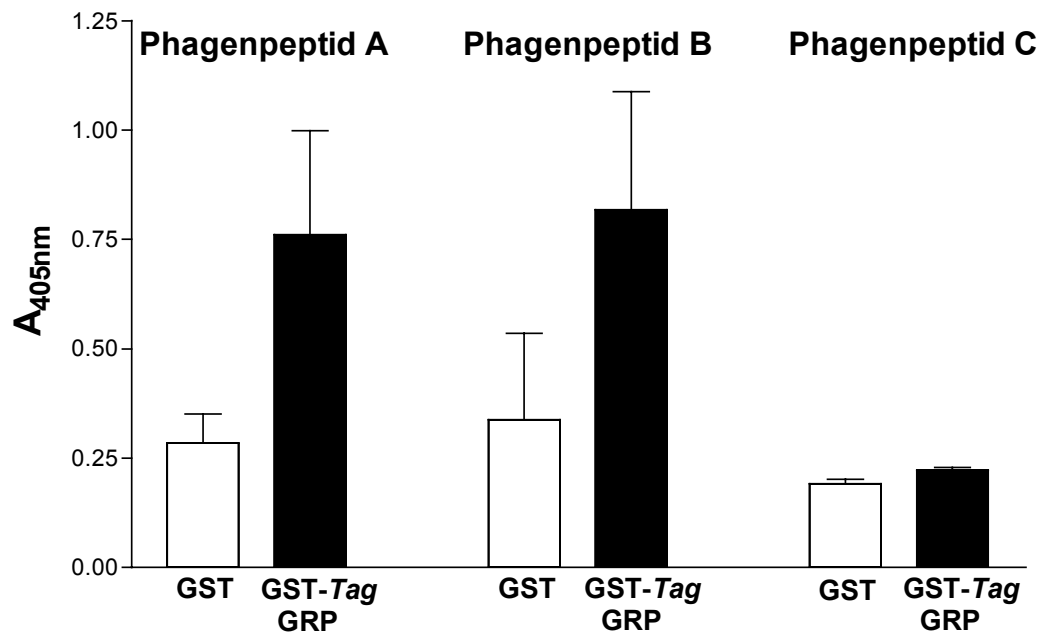


Abb. 3.51: Charakterisierung der Glucokinase-Regulatorprotein-Bindungsaffinität von selektionierten Phagenklonen durch ELISA

Drei Phagenklone wurden amplifiziert und in einer Konzentration von 10^{14} Phagen/Well in einem Phagenbindungstest auf mit GST-Tag-Glucokinase-Regulatorprotein (GST-Tag-GRP) gekoppelten und zur Kontrolle auf mit GST gekoppelten (GST) *Reacti-Bind Glutathione Coated Strips* inkubiert. Ungebundene Phagen wurden durch Waschen entfernt und gebundene Phagen mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-M13 Antikörper detektiert. Die Enzymfarbreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 20 min spektrophotometrisch (OD 405 nm) quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus drei unabhängigen Experimenten.

Phagenpeptid A = N-M-F-G-S-L-T-S-H-V-T-A, **Phagenpeptid B** = Q-V-N-Q-W-S-P-L-V-N-I-R, **Phagenpeptid C** = Q-L-Y-N-N-R-S-L-F-P-A-W.

Im ELISA konnte eine signifikante Bindung der Phagen mit der Aminosäuresequenz N-M-F-G-S-L-T-S-H-V-T-A (Phagenpeptid A) und Q-V-N-Q-W-S-P-L-V-N-I-R (Phagenpeptid B) an das Glucokinase-Regulatorprotein ermittelt werden (Abbildung 3.51). Der Phage mit der Sequenz Q-L-Y-N-N-R-S-L-F-P-A-W (Phagenpeptid C), der sich ebenfalls im 3. Panning angereichert hatte, zeigte im ELISA dagegen nur eine geringe Affinität zum GRP. Der Abstand der Aminosäure Asparagin zum Leucin, der im Phagenpeptid A und B durch vier Aminosäuren hergestellt wird, scheint somit für die Bindung entscheidend zu sein.

4 Diskussion

4.1 *Glucokinase-bindende Proteine als Regulationsprinzip der Glucosephosphorylierung in den β -Zellen des Pankreas und der Leber*

Die metabolische Stimulus-Sekretionskopplung stellt in den β -Zellen des Pankreas ein unverzichtbares Element für die Aufrechterhaltung der Blutglucosehomöostase im Organismus dar. Das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase ist in der Lage, extrazelluläre millimolare Glucosekonzentrationen an glykolytische Fluxänderungen zu koppeln und gilt somit als das Signalerkennungsenzym für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. In der Leber spielt die Glucokinase eine entscheidende Rolle für die Regulation der Glykogensynthese und Glykolyse.

Die Glucosesensorfunktion der Glucokinase rückt die Regulationsprinzipien des Enzyms in den Mittelpunkt der Betrachtung, zumal der *knockout* des Genlocus in Mäusen mit Störungen der Blutglucosehomöostase verbunden ist, der bei der β -Zelle ohne exogene Insulinsubstitution letal verläuft. In der Leber wird die Glucokinase im Wesentlichen durch die Hormone Insulin und Glucagon auf der transkriptionellen Ebene und durch Fructosemetabolite auf der Ebene der katalytischen Aktivität reguliert. In den β -Zellen des Pankreas ist hingegen Glucose der Stimulator der Glucokinasegenexpression und auf der posttranslationalen Ebene der Enzymaktivität.

Die posttranslationalen Regulationsprinzipien der Glucokinase in der β -Zelle des Pankreas sind bislang nur unzureichend verstanden. Dabei scheinen Kompartimentierungsprozesse auf der Basis bislang noch nicht aufgeklärter Proteininteraktionen eine wichtige Rolle zu spielen. Ein solches Regulationsprinzip ist in der Leber charakterisiert, in der die Glucokinase mittels eines spezifischen Glucokinase-Regulatorproteins durch kompetitive Hemmung der Enzymaktivität moduliert wird (Van Schaftingen *et al.* 1997). Die Interaktion des Enzyms mit dem Glucokinase-Regulatorprotein vermittelt in der Leber die Translokation der Glucokinase zwischen Zytoplasma und Nukleus in Abhängigkeit von Fructose und Glucose (de la Iglesia *et al.* 1999). Das molekulare Verständnis der

Interaktion zwischen der Glucokinase und dem Regulatorprotein kann wesentliche Hinweise bezüglich der Art der Interaktion zwischen den Bindungssepitopen geben.

Im Gegensatz zur Leber konnte in den β -Zellen des Pankreas weder das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber nachgewiesen werden, noch eine Translokation der Glucokinase in den Zellkern gezeigt werden. Immunhistochemische Untersuchungen ließen aber erkennen, daß die Glucokinase unter physiologischen Bedingungen heterogen im Zytoplasma lokalisiert ist und zudem eine Polarisierung zu den Gefäßen hin zu beobachten war. Im Fastenzustand kam es dagegen zu einer homogenen Verteilung der Glucokinase (Jörns *et al.* 1999). Durch eine selektive Permeabilisierungstechnik konnte in RINm5F-GK-Zellen, in denen die Glucokinase auf ein der Leber vergleichbares Niveau überexprimiert ist, eine freie Glucokinasefraktion mit einer hohen Enzymaktivität von einer gebundenen Fraktion mit niedriger Aktivität unterschieden werden. Durch Glucose wurde ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität in der Glucokinasefraktion induziert. Die Ergebnisse ließen sich an pankreatischen Ratteninseln bestätigen. Damit konnte die Freisetzung des Glucokinaseproteins von einem intrazellulären bislang unbekannten Rezeptor gezeigt werden. Aufgereinigte rekombinante β -Zell Glucokinase wurde in einem durch Permeabilisierung erhaltenen RINm5F-Zellextrakt vergleichbar der gebundenen Fraktion inhibiert. Durch vorangestellte Hitzeinaktivierung oder Proteolyse konnte diese Inhibierung verhindert werden. Dem intrazellulären Rezeptor konnte somit eindeutig Proteincharakter zugeordnet werden (Tiedge *et al.* 1999). Aus einem [35 S] L-Methionin gelabelten RINm5F-GK-Zellysat konnten ein 20 kDa und ein 80 kDa-Protein mit der Glucokinase koimmunopräzipitiert werden. Es konnte somit durch unabhängige Methoden belegt werden, daß die Glucokinase in insulinproduzierenden Zellen ebenfalls mit einem Proteinfaktor interagiert.

Da die Glucokinaseproteine der Leber und der β -Zelle bis auf die 15 N-terminalen Aminosäuren komplett identisch sind, wurden in der vorliegenden Dissertation Bindungspartner bzw. Bindungssepitope der Glucokinase durch systematische molekularbiologische Methoden untersucht. Mit der 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase als glykolytischem Regulatorenzym konnte durch diese Untersuchungen ein von dem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber differenter neuer Bindungspartner der Glucokinase identifiziert werden. Darüber hinaus gelang es, die

Bindungspeptide der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber sehr exakt einzugrenzen und durch Mutationsanalysen zu bestätigen.

Die systematische Analyse von Glucokinase bindenden Proteinmotiven erfolgte durch das *Phage Display Random-Peptide* System, dessen Strategie zur Identifizierung von Proteinbindungspartnern im Folgenden diskutiert wird (Scott & Smith 1990).

4.2 Glucokinase-Bindungspeptide

Durch die molekularbiologische Technik des *Phage Display* unter Verwendung der Ph.D.-12TM *Peptide Library* und der Durchführung von Pannings, einem Selektionsprinzip mit Waschschritten steigender Stringenz, konnten Glucokinase-Bindungspeptide in einer Art biologischen Form der kombinatorischen Chemie identifiziert werden. Für die erhaltenen Konsensuspeptide des Glucokinase-Regulatorproteins, der 6-Phosphofructo-2-kinase/ Fructose-2,6-bisphosphatase sowie dem A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L Sequenzmotiv konnten die im Phagenpanning erhaltenen Bindungsaffinitäten auch quantitativ im ELISA bestätigt werden.

4.2.1 Konsensusmotive des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber und der Phosphofructokinase Typ 2 binden an die Glucokinase

Die Basis eines *Phage Display Peptide Library Screenings* zur Isolierung von Glucokinase-Bindungspeptiden ist die Fixierung des Proteins an eine feste Oberfläche ohne Funktionsverlust. Mit Hilfe des His₆-Tag der rekombinant in *E. coli* hergestellten Glucokinase konnte diese effektiv an Ni-NTA-HisSorb-Strips gebunden werden. Diese Fixierung zeigte bezüglich der homogenen Verteilung und der katalytischen Aktivität des Glucokinaseproteins reproduzierbare Ergebnisse (Parmley & Smith 1988).

Mit Hilfe von 3 – 4 Selektionsschritten (Pannings) reicherten sich in allen Experimenten Glucokinase bindende Phagen an. Nach der Sequenzanalyse konnten in den Dodekapeptiden drei gemeinsame Konsensuspeptide identifiziert werden. Neben der hochstringenten Selektion durch eine pH-abhängige Elution der Phagen wurde auch eine kompetitive Elution mit rekombinantem GK-Protein durchgeführt. Die Anreicherung von identischen Konsensuspeptiden bestätigte hierbei die Funktionalität des durchgeführten *Phage Display Screenings* mit der Ph.D.-12TM Peptiddatenbank (Devlin *et al.* 1990). Die

identifizierten Konsensuspeptidsequenzen wurden durch Suchroutinen des EBI (*European Bioinformatics Institute*) und EMBL (*European Molecular Biology Laboratory - Protein & Peptide Group*) auf Homologien zu in den Datenbanken *Swall*, *Swissprot* und *Trembl* erfaßten Proteinen hin untersucht. Diese Standardverfahren wurden bereits erfolgreich zur Charakterisierung von isolierten *Phage Display* Bindungspeptiden mit einer Länge von 3 – 6 Aminosäuren eingesetzt (Hong & Boulanger 1995; Lauvrak *et al.* 1997).

Dabei reicherte sich ein Konsensuspeptid E-Y-L-S-A-I-V-A-G-P-W-P in Homologie zum Glucokinase-Regulatorprotein mit 39 % in den Phagenpeptiden an. Des Weiteren zeigte die der PFK2 homologe Sequenz S-L-K-V-W-T mit 10 % der angereicherten Phagenpetide ebenfalls eine signifikante Bindung an die Glucokinase.

4.2.2 Das Sequenzmotiv A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L stellt ein bislang unbekanntes neues Bindungsepitop der Glucokinase dar

Dem Sequenzmotiv A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L, das sich mit 51 % außerdem sehr stark anreicherte, konnte in den Proteindatenbanken trotz intensiver Recherchen kein Bindungspartner eindeutig zugeordnet werden. Insbesondere die Homologieanalyse der 6. – 12. Aminosäure des Dodekapeptids ergab ein Motiv, das in zahlreichen Proteinen ohne einen funktionellen Zusammenhang vertreten war und nicht als spezifische Bindungssequenz für die Glucokinase angenommen wurde. Die Analyse der Aminosäuren 1 – 6 (A-H-R-H-P-I) der Dodekapeptidsequenz zeigte Homologien zu viralen Proteinen, die physiologisch für eine Glucokinasebindung in der Leber und der β -Zelle des Pankreas nicht relevant sind. Somit könnte die Konsensuspeptidsequenz ein konformationsabhängiges Bindungsepitop eines Glucokinase bindenden Proteins darstellen, welches über die zur Verfügung stehenden Suchroutinen nicht identifizierbar ist. Hierbei ist anzumerken, daß in den Proteindatenbanken *Swall*, *Swissprot* und *Trembl* Strukturproteine nur begrenzt vertreten sind und folglich für eine Homologieanalyse nicht zur Verfügung stehen. Der Grund hierfür liegt in der Unlöslichkeit dieser zumeist multimeren Proteine, die eine Strukturaufklärung häufig nicht oder nur teilweise möglich macht.

In immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine heterogene zytosolische Glucokinaseverteilung in den β -Zellen des Pankreas beobachtet werden (Jörns *et al.* 1999), die ein gebundenes gegenüber einem diffusiblen Glucokinasekompartiment favorisieren.

Strukturproteine wie z.B. Actinfilamente (Murata *et al.* 1997) wären hierbei ideale Bindungspartner der Glucokinase in der pankreatischen β -Zelle, zumal die Glucokinasebindung an die zelluläre Matrix in selektiven Permeabilisierungsstudien durch das divalente Kation Mg^{2+} in der Bindung beeinflusst werden konnte (Tiedge *et al.* 1999).

4.3 Interaktion zwischen der Glucokinase und dem bifunktionellen Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase

Für die Konsensuspeptidsequenz S-L-K-V-W-T konnten durch Proteindatenbankanalysen zwölf homologe Proteine ermittelt werden. Davon beziehen sich neun Datenbankverweise auf das bifunktionelle regulatorische Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (EC 2.7.1.105/ EC 3.1.3.46) des Menschen und der Ratte. Die weiteren drei Eintragungen sind Fragmente dieses bifunktionellen Enzyms. Verkürzt man die Peptidsequenz um die erste Aminosäure Serin, erhält man zusätzlich Eintragungen zur PFK2 anderer Spezies. Somit konnte über die Konsensussequenz S-L-K-V-W-T der Phagenpeptide die PFK2 als Interaktionspartner der Glucokinase ermittelt werden, wobei der Bindungsbereich einerseits in einem zwischen den Spezies hochkonservierten Bereich im bifunktionellen Enzym lokalisiert ist und andererseits in keinem weiteren bekannten Protein präsentiert wird.

Die mit Hilfe des *Phage Display Library Screenings* als Glucokinase Bindungspartner identifizierte PFK2 ist ein effizienter Regulator des Glucosestoffwechsels der Leber. Das bifunktionelle Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase kontrolliert die Fructose-2,6-bisphosphatkonzentration der Zelle. Im phosphorylierten Zustand ist in der Isoform der Leber die Bisphosphatasedomäne des Enzyms aktiv und katalysiert die Bildung von Fructose-6-phosphat. Durch Dephosphorylierung ist die Fructose-2,6-bisphosphatase inhibiert und die 6-Phosphofructo-2-kinase aktiviert, was zur Synthese von Fructose-2,6-bisphosphat führt (Pilkis *et al.* 1995). Fructose-2,6-bisphosphat ist ein starker allosterischer Aktivator der 6-Phosphofructo-1-kinase (PFK1) und erhöht somit die glykolytische Fluxrate. Zudem wird die Gluconeogenese durch Deaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase gehemmt. Neben der PFK2 der Leber konnten vier weitere Isoformen des Enzyms in Skelettmuskel, Herz, Testes und Gehirn nachgewiesen werden (Pilkis *et al.* 1995). Diese Isoformen unterscheiden sich sowohl in den kinetischen Eigenschaften als

auch in der Regulation durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A. Die regulatorische Funktion des Enzyms in der Leber ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt.

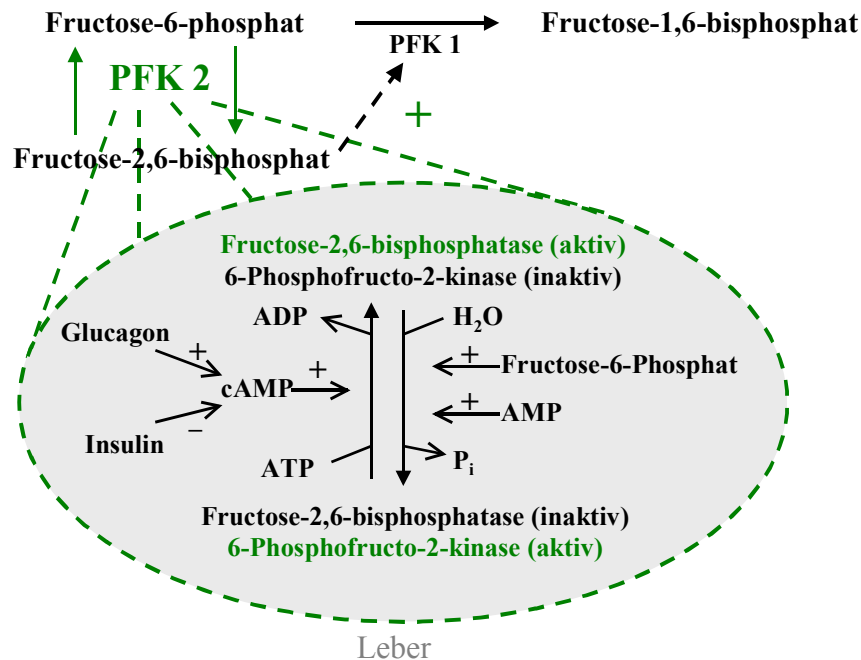


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Regulation des bifunktionellen Enzyms PFK2 in der Leber

Für die Interaktion der PFK2 mit der Glucokinase ist das ²⁸⁹S-L-K-V-W-T³⁰³ Motiv in der Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne verantwortlich. Auf Grundlage der für die Fructose-2,6-bisphosphatase ermittelten Kristallstruktur kann von einer Präsentation dieser Residuen im Bereich eines β -Faltblattes ausgegangen werden, einer Konformation, die prinzipiell einer Interaktion von der Oberfläche des Enzymmoleküls her zugänglich ist (Bazan *et al.* 1989; Bertrand *et al.* 1997b; Lee *et al.* 1996).

Um die Interaktion der Glucokinase mit der PFK2 weiter zu charakterisieren, wurde die das Bindungsepitop präsentierende Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Durch eine integrierte PreScission Protease Erkennungssequenz war die Fructose-2,6-bisphosphatase nicht nur als Fusionsprotein, sondern nach Abtrennung des GST-Tags auch als natives Protein zugänglich. Sowohl das native Protein als auch das Fusionsprotein zeigten eine

katalytische Aktivität, wie sie in der Literatur bereits für das rekombinant exprimierte Enzym beschrieben worden ist (Bertrand *et al.* 1997a; Rider *et al.* 1995). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Fructose-2,6-bisphosphatase einer Zweisubstrat-Zweiprodukt-hemmung im Sinne einer Ping-Pong Bi-Bi-Reaktion unterliegt, die sowohl auf einer nichtkompetitiven Hemmung als auch auf einer Substrathemmung durch Fructose-6-phosphat und Fructose-2,6-bisphosphat beruht (Kurland *et al.* 1992; Kurland *et al.* 1993; Lee *et al.* 1994; Tauler *et al.* 1989; Tauler *et al.* 1988). Dieser Aspekt ist für die Bewertung der kinetischen Charakteristika wichtig, da der enzymgekoppelte Assay aus Sensitivitätsgründen mit Substratkonzentrationen > 100 nM durchgeführt wurde (van Schaftingen *et al.* 1982). Es konnten mit einem V_{\max} -Wert von 30 mU/mg und einem K_m -Wert von 1,5 μ M Werte für die native Fructose-2,6-bisphosphatase ermittelt werden, die mit den in der Literatur beschriebenen Daten gut übereinstimmen (Bertrand *et al.* 1997a; Rider *et al.* 1995; Tauler *et al.* 1988).

Für das Enzym Fructose-2,6-bisphosphatase konnte im *in vitro* Bindungsassay eine Interaktion zur Glucokinase gezeigt werden. Daß die bekannte Interaktion zwischen der Glucokinase und dem Glucokinase-Regulatorprotein ebenfalls in dem unter Verwendung von Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* durchgeführten *Magnetocapture* Bindungsassay nachgewiesen werden konnte, beweist die Validität des Assays.

Der Nachweis der Interaktion zwischen der Glucokinase und der Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne der PFK2 eröffnet die Frage, ob diese Bindung die kinetischen Eigenschaften der Enzyme im Sinne einer Hemmung oder Aktivierung beeinflusst. In einer Koinkubation der rekombinanten Enzyme Glucokinase und Fructose-2,6-bisphosphatase konnte kein Einfluß auf die K_m - und V_{\max} -Werte der beiden Enzyme ermittelt werden. Um zu klären, ob die Bindung des Holoenzym PFK2 an die Glucokinase eine Veränderung der kinetischen Parameter der Enzyme bedingt, sollte die PFK2 ebenfalls rekombinant exprimiert werden. In der Hefe *S. pombe*, nicht aber in *E. coli* war es möglich, das bifunktionelle Enzym als katalytisch aktives GST-Tag-Fusionsprotein rekombinant zu exprimieren. Eine Abtrennung des GST-Tags konnte bei diesem Fusionsprotein aufgrund des Fehlens einer spezifischen Protease Erkennungssequenz nicht erfolgen. Für das Glucokinase-Regulatorprotein wurde in der vorliegenden Dissertation ein Hefeexpressionsvektor entwickelt, der die Integration einer PreScission Protease

Erkennungssequenz in das Fusionsprotein ermöglichte. Damit konnte ein rekombinantes natives Glucokinase-Regulatorprotein synthetisiert werden, dessen Hemmung der Glucokinase nachgewiesen werden konnte. Vergleichbar soll in weiterführenden Studien dieses System auch für die Synthese eines rekombinanten bifunktionellen PFK2 Proteins verwendet werden. Die Bindung des PFK2 Holoenzym an die Glucokinase könnte dabei durchaus eine stabilisierende Wirkung auf die Glucosephosphorylierungsaktivität haben, da Konformationsänderungen, die eine SH-Gruppenoxidation fördern, unter diesen Bedingungen verlangsamt ablaufen würden. Hochaffine 100 kDa Hexokinasen, die einen der Glucokinase vergleichbaren Anteil von freien SH-Gruppen im katalytisch aktiven C-terminalen Molekülteil besitzen, sind wahrscheinlich aufgrund der eingeschränkten Mobilität unempfindlicher gegenüber einer spontanen Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken. Darüber hinaus würde durch die Bindung der Glucokinase an die PFK2 eine Fixierung des glucosephosphorylierenden Schrittmacherenzym an allosterisch regulierte Enzymkomplexe der Glykolyse gewährleistet, die eine optimale metabolische Kopplung zur Folge hätte, die für andere glykolytische Enzyme im Sinne eines *Metabolic Channeling* bereits beschrieben wurde (Ovadi & Srere 1996; Ovadi & Srere 2000).

Um die *in vitro* im *Phage Display* System und im *Magnetocapture* Assay gezeigte Interaktion der Glucokinase mit der PFK2 auch *in vivo* nachzuweisen, wurde das Hefe *Two Hybrid* System etabliert. In diesem zur Analyse von Proteinwechselwirkungen entwickelten System konnte bereits die Interaktion zwischen der Glucokinase und dem GRP gezeigt werden (Mookhtiar *et al.* 1996) und in der vorliegenden Dissertation auch quantifiziert werden. Im *Two Hybrid* Experiment konnte nicht nur eine Bindung der PFK2 an die Glucokinase nachgewiesen werden, sondern diese Bindung eindeutig der Fructose-2,6-bisphosphatase zugeordnet werden. Somit zeigt die PFK2 eine deutliche Interaktion mit der Glucokinase, die im *Two Hybrid* System schwächer war als die Bindung an das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber. Eine schwächere Bindung könnte sich dabei wie oben bereits diskutiert unter dem funktionellen Aspekt einer Stabilisierung der Glucokinase als Vorteil erweisen, da eine starke Interaktion wie beim GRP zumeist eine Hemmung der katalytischen Aktivität zur Folge hat.

Der Hefe *Two Hybrid* Assay ermöglichte zudem, die Dimerisierung der PFK2 in diesem molekularbiologischen System direkt zu demonstrieren. Es bestätigte sich hierbei die aus

Untersuchungen an mutierten PFK2 Proteinen sowie chimären Proteinen resultierende Annahme, daß eine homophile Interaktion der 6-Phosphofructo-2-kinasedomäne für diese Dimerisierung verantwortlich ist (Pilkis *et al.* 1995; Tauler *et al.* 1989; Tauler *et al.* 1988). Dieser Aspekt ist für die Glucokinaseinteraktion sehr wichtig, da in einem über die Kinase stabilisierten dimeren PFK2 Protein die Bisphosphatasedomänen für eine Interaktion sterisch frei zugänglich vorliegen. Es ist daher perspektivisch in weiteren Untersuchungen zu klären, welchen Einfluß die Interaktion zwischen diesen zytosolischen Proteinen auf metabolische Regulationen in der Leber und den β -Zellen des Pankreas besitzt. Studien an Ratteninseln konnten zeigen, daß die PFK2 in β -Zellen des Pankreas exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen scheint die 6-Phosphofructo-2-kinase des bifunktionellen Enzyms aktiviert zu sein, während die Fructose-2,6-bisphosphatase inhibiert ist. Dies erklärt, daß der Fructose-2,6-bisphosphat Spiegel bei steigender Glucosekonzentration in der β -Zelle sofort ansteigt und durch Glucagon nicht reduziert wird (Sener *et al.* 1984). Damit ist eine Regulation des β -Zell PFK2 Enzyms durch intrazelluläre Konzentrationsänderungen der Metabolite wahrscheinlich, die auch der Funktion der pankreatischen β -Zelle, effektiv den Metabolismus an Veränderungen der extrazellulären Glucosekonzentration anzupassen, gerecht wird (Sakurai *et al.* 1996). Es wäre also durchaus denkbar, daß die *in vitro* und *in vivo* nachgewiesene Interaktion zwischen der Glucokinase und der PFK2 im Sinne einer Enzymstabilisierung bzw. -aktivierung und eines *Metabolic Channeling* (Berry *et al.* 1992; Ovadi & Srere 1996; Ovadi & Srere 2000; Spivey & Merz 1989; Srere & Ovadi 1990; Welch & Easterby 1994) fungiert. Ein solches Regulationsprinzip der β -Zelle des Pankreas besitzt wahrscheinlich eine geringere Fähigkeit der Glucokinasemodulation als dies durch die Translokation in der Leber der Fall ist. Andererseits ist die Funktion der Glucokinase für die β -Zelle unverzichtbar und würde bei einer Aktivitätsabnahme von mehr als 50 % zu einem Verlust der glucoseinduzierten Insulinsekretion führen. Somit macht es durchaus Sinn, daß die Stabilisierung der Sensorfunktion der Glucokinase in der β -Zelle des Pankreas allerhöchste Priorität besitzt.

4.4 Interaktion zwischen der Glucokinase und dem Glucokinase-Regulatorprotein der Leber

In der Leber konnte das Glucokinase-Regulatorprotein als kompetitiver Inhibitor der Glucokinase identifiziert werden (Van Schaftingen 1989). Dabei fungiert Fructose-6-

phosphat als Aktivator der Enzym-Inhibitor-Komplexbildung, die durch Fructose-1-phosphat wiederum gehemmt wird (Vandercammen *et al.* 1992; Vandercammen & Van Schaftingen 1990; Vandercammen & Van Schaftingen 1991). Bislang gelang weder die kristallographische Darstellung des Glucokinase-Regulatorproteins, noch konnte innerhalb des Proteins ein Bindungssepitop für die Glucokinasebindung verantwortlich gemacht werden. Das von van Schaftingen postulierte Bindungsmodell (Van Schaftingen *et al.* 1997) basiert auf der Annahme, daß das GRP wie die Glucokinase als zweischenkeliges Protein vorliegt und beide Proteine über einen weiten Bindungsbereich interagieren können, wenn das katalytische Zentrum der Glucokinase nicht durch Glucose besetzt ist und Fructose-6-phosphat an das GRP gebunden vorliegt.

4.4.1 Das Konsensusmotiv ¹⁸⁸L-S-A-X-X-V-A-G¹⁹⁵ bestimmt die Interaktion des Glucokinase-Regulatorproteins mit der Glucokinase

Durch Datenbankanalysen konnte der gesamten Konsensuspeptidsequenz E-Y-L-S-A-V-A-G-P-W-P zunächst kein homologes Protein zugeordnet werden. Für die Strategie zur Evaluierung von Bindungsdomänen, die aus 3–6 Aminosäuren bestehen und häufig diskontinuierlich oder konformationsabhängig sind, ist wichtig, daß benachbarte saure oder basische Zentren für die Stabilisierung der Bindung notwendig sind (Gardsvoll *et al.* 1998; Hong & Boulanger 1995; Lauvrak *et al.* 1997; Parhami-Seren *et al.* 1997). Eine detaillierte Homologiesuche auf Teilsequenzen zeigte schließlich eine Homologie des Sequenzmotivs X-L-S-A-X-V-A-G zum Glucokinase-Regulatorprotein der Leber. Die insgesamt 41 aus der Suche resultierenden Datenbankeintragen konnten auf fünf relevante Säugetierproteine eingeschränkt werden, die sich alle auf das humane Glucokinase-Regulatorprotein oder das der Ratte bezogen. Das GRP als bekannter Interaktionspartner der Glucokinase konnte mit Hilfe des durchgeführten *Phage Display* Experiments als solcher ermittelt werden. Somit war es erstmalig möglich, durch eine systematische Methodik die Bindungssequenz ¹⁸⁸L-S-A-X-X-V-A-G¹⁹⁵ innerhalb des Glucokinase-Regulatorproteins für die Interaktion zur Glucokinase verantwortlich zu machen.

4.4.2 Aliphatische und neutrale Aminosäuren vermitteln die Bindung des Glucokinase-Regulatorproteins an die Glucokinase

Durch die *Two Hybrid* Methode konnten *in vivo* Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen der Glucokinase und dem GRP Wildtyp sowie mutierten Proteinen quantifiziert werden. In Experimenten, in denen die Glucokinase und das GRP als Fusionsproteine mit der Aktivierungsdomäne und der Bindungsdomäne des Transkriptionsaktivators GAL4 in Hefezellen exprimiert wurden, kam es durch die Wechselwirkung der beiden Proteine zur Aktivierung der Transkription im Sinne einer positiven *Two Hybrid* Reaktion. Dabei wurde die Reaktion nicht nur einseitig (Mookhtiar *et al.* 1996), sondern auch im reziproken Ansatz durch eine Aktivierung des Reportergens *HIS3* und durch die Aktivierung des Reportergens *lacZ* mit einem 20fachen Anstieg der spezifischen Aktivität quantifiziert.

Um die Bindungseigenschaften des ermittelten Aminosäureepitops auch *in vivo* zu überprüfen, wurden die sechs Aminosäuren mit Hilfe des vektorgestützten *Altered Sites II in vitro Mutagenesis Systems* mutiert, um eine Veränderung der räumlichen bzw. elektrostatischen Bindungseigenschaften der GRP-Domäne nach den biophysikalischen Regeln der Proteininteraktion zu erreichen. Dabei wurden die aliphatischen Aminosäuren ¹⁸⁸Leucin und ¹⁹⁴Alanin gegen die saure Aminosäure Asparaginsäure ausgetauscht sowie ¹⁹³Valin und ¹⁹⁰Alanin gegen Glutaminsäure. Die kurzkettigen Aminosäuren ¹⁸⁹Serin und ¹⁹⁵Glycin wurden durch das langkettige Arginin ersetzt. Anschließend wurde das Bindungsverhalten der sechs Mutanten des Glucokinase-Regulatorproteins zur Glucokinase im *Two Hybrid* Experiment bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, daß eine Mutation der Aminosäuren Ser-182, Val-186 und Ala-187 zu einem kompletten Verlust der GRP-GK Interaktion führt. Die Mutation der Aminosäuren Leu-181, Ala-183 und Gly-188 bedingt im Vergleich zum Wildtyp GRP eine um 50 % herabgesetzte Bindungsstärke zur Glucokinase. Somit kann angenommen werden, daß die Aminosäuresequenz ¹⁸¹L-S-A-P-F-V-A-G¹⁸⁸ konformationsabhängig so präsentiert wird, daß die neutralen Residuen Ser-182, Val-186 und Ala-187 an der Oberfläche des Proteins ein Bindungsepitop ausbilden und damit primär für die Interaktion zur Glucokinase verantwortlich sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß neben den Aminosäureresiduen Leu-181, Ala-183 und Gly-188 weitere Aminosäuren in räumlicher Nähe auch einen stabilisierenden Einfluß auf die Interaktion zwischen der Glucokinase und dem GRP ausüben.

4.4.3 Ein in das nukleäre Exportsignal integrierte Asparagin-Leucinmotiv der

Glucokinase vermittelt die Interaktion mit dem Glucokinase-Regulatorprotein

Bislang konnte das Glucokinase-Regulatorprotein in *E. coli* nur in geringen Mengen und unter aufwendigen Kulturbedingungen als natives Protein exprimiert werden (Detheux & Van Schaftingen 1994; Mookhtiar *et al.* 1996), wobei alle Untersuchungen auf dem aufgereinigten Rattenleberprotein basieren (Detheux *et al.* 1991; Vandercammen *et al.* 1992; Vandercammen & Van Schaftingen 1990; Vandercammen & Van Schaftingen 1991; Vandercammen & Van Schaftingen 1993). In der vorliegenden Dissertation war es in der Hefe *S. pombe* möglich, das Glucokinase-Regulatorprotein der Ratte als GST-Fusionsprotein zu exprimieren und durch Affinitätschromatographie mit kombinierter Proteasebehandlung als natives Protein aufzureinigen. Mit Hilfe des *Magnetocapture* Assays konnte *in vitro* eine Bindung dieses Proteins an die Glucokinase gezeigt werden. In einem enzymgekoppelten photometrischen Test wurde die Glucokinaseenzymaktivität durch das rekombinant exprimierte Glucokinase-Regulatorprotein inhibiert, was die Funktionalität der Bindung zusätzlich bestätigt.

Mit Hilfe des *Phage Display* Library Screenings unter Verwendung der Ph.D.-12TM Bibliothek wurde eine Bindungsdomäne im Glucokinase-Regulatorprotein lokalisiert, die für die Interaktion zur Glucokinase verantwortlich ist. Im reziproken systematischen Selektionsprozeß, bei dem rekombinantes Glucokinase-Regulatorprotein an eine feste Oberfläche gebunden wurde, gelang es, Aminosäureresiduen im Glucokinasemolekül zu bestimmen, die für das Bindungsverhalten von entscheidender Bedeutung sind.

Im *Phage Display* Experiment konnten nach drei Panning-Selektionsschritten Glucokinase-Regulatorprotein bindende Phagen isoliert werden. Sowohl im 2. als auch im 3. Panning dominierte dabei die Anreicherung der Aminosäure Asparagin in den isolierten Dodekapeptiden. Aufgrund der Antigenität der zur Fixierung verwendeten Glutathion-S-Transferase war die Durchführung eines Kontroll-experiments, in dem nur GST an die *Strips* gebunden wurde, notwendig. In diesem Panning GST konnte keine vergleichbare Anreicherung der Aminosäure Asparagin festgestellt werden. Weiterhin war das Auftreten der Aminosäure Leucin im Abstand von einer oder vier Aminosäuren zum Asparagin auffällig. Solche Motive konnten in den Dodekapeptiden des Kontroll-experiments nicht identifiziert werden. Durch ELISA Bindungsexperimente konnte eindeutig für die

Dodekapeptide eine hohe Affinität zum Glucokinase-Regulatorprotein nachgewiesen werden, die die Aminosäure Asparagin in einem Abstand von vier Aminosäuren zum Leucin zeigten. Somit reicherte sich die Konsensussequenz N-X-X-X-X-L bzw. L-X-X-X-N spezifisch als Glucokinase-Regulatorprotein bindende Peptidsequenz an.

Bei der systematischen Analyse der Glucokinase Aminosäuresequenz unter Einbezug des theoretischen Glucokinasestrukturmodells (St. Charles *et al.* 1994) waren drei Motive identifizierbar, die die beschriebene Konsensussequenz trugen. Die Aminosäuren ³⁵⁰Asparagin und ³⁵⁵Leucin sowie ³⁰⁹Leucin und ³¹³Asparagin sind im zweischenkeligen Glucokinasemolekül an der Spitze der größeren Domäne lokalisiert und damit für eine Bindung frei zugänglich. Außerdem besteht eine sterische Nähe der Aminosäuren ⁵⁸Leucin und ²⁰⁴Asparagin, deren Präsentation aber im Winkel der beiden Domänen erfolgt und folglich weniger zugänglich ist. Durch Mutation der Aminosäure ²⁰⁴Asparagin im Glucokinasemolekül konnte bereits eine Reduktion der Bindungsaffinität zum Glucokinase-Regulatorprotein festgestellt werden (Veiga-da-Cunha *et al.* 1996). Andererseits ist diese Aminosäure nachweislich im katalytischen Zentrum des Enzyms lokalisiert und an der Glucosebindung beteiligt (Xu *et al.* 1995; Xu *et al.* 1994). Daher könnte die durch Mutation dieser Aminosäure bewirkte Veränderung der physikalischen Eigenschaften des katalytischen Zentrums sekundär auch das Bindungsverhalten beeinflussen, ohne primär daran beteiligt zu sein.

Im Glucokinasemolekül sind von Magnuson und Mitarbeitern (Shiota *et al.* 1999) kürzlich zwei Motive postuliert worden, die eine Homologie zum klassischen NES (Nuclear Export Signal) aufweisen. Von diesen NES-homologen Sequenzen wird eine Sequenz aufgrund von mutierten GFP-Fusionsproteinen als ein Signal für den nukleären Export der Glucokinase nach Dissoziation des Glucokinase-Glucokinase-Regulatorproteinkomplexes angesehen (Shiota *et al.* 1999). Interessanterweise sind die Aminosäuren ³⁵⁵Leucin und ³⁰⁹Leucin in diesen beiden postulierten NES der Glucokinase vertreten. Damit besitzen die charakterisierten Motive eine duale Funktion, welche die Translokation der Glucokinase vom Nukleus in das Zytoplasma erklären kann. Befindet sich die Glucokinase im Nukleus und kommt es zur Dissoziation des Glucokinase-Glucokinase-Regulatorproteinkomplexes, wäre das NES, welches zuvor durch die Bindung maskiert war, frei und führt zur Bindung an den nukleären Porenkomplex und somit zur Translokation der Glucokinase ins

Zytoplasma. In weiterführenden Experimenten mit Hilfe von Mutationsanalysen und *Two Hybrid* Studien gilt es, die postulierten Bindungsepitope dieses Modells zu verifizieren.

4.4.4 Das Glucokinase-Regulatorprotein ist im *Two Hybrid* Screening der entscheidende Modulator für Translokationsprozesse der Glucokinase in der Leber

An Hepatozyten konnte eindeutig gezeigt werden, daß während niedriger Glucosekonzentrationen die Glucokinase und das Glucokinase-Regulatorprotein im Nukleus lokalisiert sind. Ansteigende Glucosekonzentrationen führen zu einer Translokation der Glucokinase ins Zytoplasma (Brown *et al.* 1997; Miwa *et al.* 1990; Toyoda *et al.* 1994; Toyoda *et al.* 1995a; Toyoda *et al.* 1995b). Interessanterweise kommt es nur bei Anwesenheit des Glucokinase-Regulatorproteins bei niedrigen Glucosekonzentrationen zu einer Anreicherung der Glucokinase im Zellkern. Durch Überexpression der Glucokinase und des Glucokinase-Regulatorproteins als Fusionsproteine mit dem GFP bzw. BFP (Green/Blue Fluorescent Protein) konnte das gleiche Phänomen mittels Konfokaler Laser Mikroskopie auch an COS-1- und HeLa-Zellen gezeigt werden (de la Iglesia *et al.* 1999). Daher wurde postuliert, daß eine ubiquitär in Zellen vorhandene Struktur für den Translokationsmechanismus der Glucokinase verantwortlich ist.

Das bereits zur Charakterisierung der bekannten Proteininteraktion Glucokinase-Glucokinase-Regulatorprotein eingesetzte *Two Hybrid* System bietet nun weiterhin die Möglichkeit, neue Proteinbindungspartner unter Verwendung einer pACT-cDNA-Datenbank zu identifizieren. Um zu klären, ob für die Glucokinase Translokationsprozesse in der Leber nur das bekannte Glucokinase-Regulatorprotein oder noch weitere bislang unbekannte Proteinfaktoren notwendig sind, wurde ein *Two Hybrid* Screening mit einer *Rat Liver* MATCHMAKER *cDNA Library* durchgeführt. In diesem Screening Experiment wurden 10^6 Libraryklone analysiert, womit die Anforderungen an eine repräsentative cDNA-Datenbankanalyse erfüllt werden konnten (Chien *et al.* 1991). Aus 13 isolierten Klonen konnten sechs identifiziert werden, die eine Aktivierung beider Reportergene des *Two Hybrid* Systems zeigten. Durch Sequenzanalyse konnte in allen der sechs Klone das Glucokinase-Regulatorprotein als Interaktionspartner bestimmt werden. Aus der Leberdatenbank konnte folglich kein weiterer Bindungspartner der Glucokinase

identifiziert werden. Es kann davon ausgegangen werden, daß die durch die *Rat Liver cDNA Library* vermittelte Genexpressionshäufigkeit von mRNA Spezies in etwa der Proteinexpression der Leber entspricht. Somit dominiert das Glucokinase-Regulatorprotein von der Stöchiometrie der Expression die Regulation der Glucokinase in der Leber. Da die Translokationsprozesse nicht nur an Hepatozyten gezeigt werden konnten, sondern durch transiente Überexpression der cDNAs auch auf COS-1- und HeLa-Zellen übertragen werden konnten (de la Iglesia *et al.* 1999), scheinen die Glucokinase und das Glucokinase-Regulatorprotein alle für diesen Mechanismus notwendigen Bindungsepitope zu besitzen. Es ist daher unwahrscheinlich, daß für die nukleären Translokationsprozesse andere leberspezifische Proteine erforderlich sind. Um diese Frage befriedigend zu klären, muß in weiterführenden Studien eine systematische *Two Hybrid* cDNA-Libraryanalyse einer Zelllinie erfolgen, die konstitutiv kein GRP exprimiert z.B. der insulinproduzierenden RINm5F- oder INS-1 Zelle.

Das in der vorliegenden Dissertation etablierte *Two Hybrid Library Screening* bietet die Perspektive, Interaktionspartner der Glucokinase in der β -Zelle des Pankreas zu charakterisieren, die vergleichbar dem Glucokinase-Regulatorprotein in der Leber, einen von der Expressionsstöchiometrie dominanten Bindungspartner darstellen. Die Herstellung einer *Two Hybrid* pACT β -Zell cDNA Library stellt zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Basis für die Identifizierung weiterer Bindungspartner der Glucokinase dar und erlaubt auch die Charakterisierung des hochaffinen Bindungsmotivs aus den *Phage Display* Studien, dem bislang kein bekannter Proteinfaktor zugeordnet werden konnte. Die Strategie der optimierten Kombination aus molekularbiologischer Proteininteraktionsanalyse, rekombinanter Proteinexpression und funktionellen kinetischen Untersuchungen wird es ermöglichen, aus dem molekularen Verständnis der komplexen Regulationsprinzipien der Glucokinase in den β -Zellen des Pankreas therapeutische Strategien zu entwickeln, die den Glucosesensor in seiner Aktivität stabilisieren und Störungen der Stimulus-Sekretionskopplung verhindern.

5 Zusammenfassung

Die glucoseinduzierte Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas wird über den Metabolismus des Substrats vermittelt. Die Glucokinase (Hexokinase Typ IV) koppelt als niedrigaffines glucosephosphorylierendes Enzym physiologische millimolare Glucosekonzentrationen an die Glykolyse der β -Zelle. Als fluxkontrollierendes Enzym stellt die Glucokinase einen Glucosesensor dar, der für die normale Funktion der β -Zelle essentiell notwendig ist. Die Stimulus-Sekretionskopplung der pankreatischen β -Zelle unterscheidet sich daher maßgeblich von anderen neuroendokrinen Zelltypen, bei denen eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion im Vordergrund steht.

Die vorliegende Dissertation beschreibt die molekularen Grundlagen der Interaktion der Glucokinase mit Proteinfaktoren als Prinzipien der komplexen Regulation der Glucokinase in β -Zellen des Pankreas und der Leber auf der posttranslationalen Ebene.

Die Bindung der Glucokinase an ein regulatorisches Protein moduliert die Glucosephosphorylierungsaktivität in insulinproduzierenden Zellen. Mit der Entdeckung des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber wurde ein Prinzip der Glucokinaseregulation beschrieben, das auf der Interaktion mit einem Bindungspartner beruht. In Hepatozyten bewirkt dieses regulatorische Protein eine kompetitive Hemmung der Glucokinaseenzymaktivität sowie eine Translokation in den Zellkern, die das Enzym dem zytoplasmatischen Kompartiment der Glykolyse entzieht. In den β -Zellen des Pankreas wird das Glucokinase-Regulatorprotein der Leber nicht exprimiert. Durch eine selektive Permeabilisierungstechnik konnte jedoch gezeigt werden, daß die Glucokinase in insulinproduzierenden Zellen auch mit einem zellulären Proteinfaktor interagiert. Durch die Bindung an diesen bislang nicht charakterisierten Proteinfaktor konnte eine gebundene Fraktion der Glucokinase mit einer niedrigen spezifischen Aktivität von einer diffusiblen Fraktion unterschieden werden.

Potentielle Glucokinase Bindungsepitope wurden in der vorliegenden Dissertation durch ein systematisches Screening einer *Phage Display Random-Peptide Library* charakterisiert.

Basierend auf der funktionellen Präsentation der Glucokinase an einer festen Oberfläche und einem Selektionsprozeß mit steigender Stringenz, konnten aus der Phagenbibliothek solche Phagen isoliert werden, deren an der Oberfläche exprimierte Dodekapeptidsequenz eine spezifische Bindungsaffinität zur Glucokinase besitzt. Es gelang aus dem Pool der erhaltenen Sequenzen drei Konsensusmotive zu identifizieren, deren Interaktion mit der Glucokinase in ELISA Experimenten eindeutig belegt werden konnte. Standardsuchroutinen in Proteindatenbanken ermöglichten eine Zuordnung der Konsensuspeptidsequenzen zu homologen Proteinen.

Mit der innovativen Methode des *Phage Display* Screenings konnten spezifische Bindungsepitope (1) des Glucokinase-Regulatorproteins der Leber und (2) des bifunktionellen Enzyms 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase als Glucokinase Interaktionspartner identifiziert werden. Eine dritte Peptidsequenz A-H-R-H-P-I-S-F-L-S-T-L, die eine starke Anreicherung im Phagenscreening zeigte, konnte in den Proteindatenbanken keinem bekannten Protein zugeordnet werden.

Die GK-PFK2 Interaktion wird über ein Bindungsepitop der Fructose-2,6-bisphosphatasedomäne des bifunktionellen Enzyms vermittelt. Diese Domäne konnte in *E. coli* als katalytisch aktives Enzym exprimiert werden, welches im *in vitro* Bindungsassay eine Interaktion mit der Glucokinase zeigte. Im Hefe *Two Hybrid* System gelang es *in vivo* eine Bindung der Glucokinase an die PFK2 und die Fructose-2,6-bisphosphatase, nicht aber an die 6-Phosphofructo-2-kinase nachzuweisen. Die Dimerisierung der PFK2 auf der Basis einer homophilen Interaktion der 6-Phosphofructo-2-kinasedomäne eröffnet ein Modell des über die Kinase stabilisierten dimeren PFK2 Proteins, deren Bisphosphatasedomänen für eine Glucokinasebindung sterisch frei zugänglich vorliegen. Die erstmalig beschriebene Interaktion zwischen der Glucokinase und der in den β -Zellen des Pankreas nachweislich exprimierten PFK2 könnte sich im Sinne einer Enzymstabilisierung bzw. eines *Metabolic Channeling* in das Prinzip der metabolischen Stimulus-Sekretionskopplung der β -Zelle integrieren. In weiterführenden Studien gilt es zu klären, ob die Bindung des Holoenzym PFK2 an die Glucokinase eine Veränderung der kinetischen Parameter der Enzyme bedingt.

In der Leber ist das Glucokinase-Regulatorprotein als kompetitiver Inhibitor der Glucokinase bekannt. Molekulare Detailkenntnisse zu dieser Interaktion, die auch für die Glucokinasebindung an andere Proteine bedeutungsvoll sein könnten, lagen bislang aber

noch nicht vor. Aus dem durch das *Phage Display* Screening ermittelten Bindungssepitop konnten durch Mutationsanalysen und *Two Hybrid* Studien die neutralen Aminosäuren Ser-182, Val-186 und Ala-187 im Glucokinase-Regulatorprotein als primäre Bindungsresiduen der Glucokinase charakterisiert werden.

In der Leber erfolgt eine glucoseabhängige Translokation der Glucokinase zwischen Zytoplasma und Nukleus, an der das GRP als nukleäres Ankerprotein beteiligt ist. Für den Prozeß des nukleären Exports wurden neben dem GRP weitere Bindungspartner der Glucokinase postuliert. In einem mit einer *Rat Liver cDNA Two Hybrid Library* durchgeführten Screening wurde das GRP als einziger Glucokinase Bindungspartner in der Leber aus 10^6 analysierten Libraryklonen isoliert. Diese Befunde legen nahe, daß die Glucokinase als freies Enzymprotein den nukleären Export in der Leber durch Bindung eines dem nukleären Exportsignal (NES) homologen Bindungsmotivs initiieren kann. Ein analog zur Glucokinase durchgeführtes *Phage Display Library* Screening auf Glucokinase-Regulatorprotein bindende Phagenpeptide hin resultierte in der Anreicherung eines spezifischen Bindungssequenzmotivs, in dem die Aminosäure Asparagin im Abstand von vier Aminosäuren zum Leucin dominiert. Dieses Motiv war im Glucokinasmolekül dreimal identifizierbar. Das Leucin ist in zwei dieser Epitope Bestandteil eines NES, welches erst kürzlich für die Glucokinase durch Mutationsanalysen von GK-GFP-Fusionsproteinen beschrieben wurde. Durch diese duale Funktion des Bindungsbereichs kann aufgrund der vorliegenden Befunde ein Translokationsmodell formuliert werden, nach dem die Glucokinase nur dann mittels des NES vom Nukleus ins Zytoplasma gelangen kann, wenn sie nicht durch den GK-GRP-Komplex maskiert ist.

Das detaillierte Verständnis der molekularen Mechanismen der Glucokinase Proteininteraktion eröffnet neue Perspektiven für eine therapeutische Modulation der Glucokinaseenzymaktivität. Sowohl in der Leber als auch in der β -Zelle des Pankreas spielen posttranslationale Regulationsmechanismen offenbar eine entscheidende Rolle sowohl für Translokationsmechanismen als auch für die Aufrechterhaltung der Signalfunktion des Glucokinaseenzyms. Die hieran beteiligten Interaktionen der Glucokinase mit regulatorischen Proteinen konnten in der vorliegenden Dissertation durch systematische *Phage Display* und *Two Hybrid* Techniken ermittelt werden. Das Ziel dieser Studien war die Analyse der stabilisierenden bzw. aktivierenden Effektoren der

Glucokinase, die eine optimale Glucosephosphorylierung in der β -Zelle gewährleisten. Von einer Beeinflussung solcher Effektoren könnten im Rahmen eines Therapiekonzepts insbesondere Patienten profitieren, deren β -Zellfunktion beim Typ 2 Diabetes mellitus beeinträchtigt ist.

6 Literaturverzeichnis

- Agius, L. (1994a).** Control of glucokinase translocation in rat hepatocytes by sorbitol and the cytosolic redox state. *Biochem J* **298**: 237-243.
- Agius, L. (1994b).** Hexokinase and glucokinase binding in permeabilized guinea-pig hepatocytes. *Biochem J* **303**: 841-846.
- Agius, L. (1996).** Substrate modulation of aldolase B binding in hepatocytes. *Biochem J* **315**: 651-658.
- Agius, L. & Peak, M. (1993).** Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem J* **296**: 785-796.
- Agius, L. & Peak, M. (1997).** Binding and translocation of glucokinase in hepatocytes. *Biochem Soc Trans* **25**: 145-150.
- Agius, L., Peak, M., Newgard, C.B., Gomez-Foix, A.M. & Guinovart, J.J. (1996).** Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. *J Biol Chem* **271**: 30479-86.
- Agius, L., Peak, M. & Van Schaftingen, E. (1995).** The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. *Biochem J* **309**: 711-713.
- Agius, L. & Stubbs, M. (2000).** Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. *Biochem J* **346 Pt 2**: 413-21.
- Aguilar-Bryan, L., Clement, J.P.t. & Nelson, D.A. (1998).** Sulfonylurea receptors and ATP-sensitive potassium ion channels. *Methods Enzymol* **292**: 732-44.
- Anderson, C.M., Stenkamp, R.E., McDonald, R.C. & Steitz, T.A. (1978).** A refined model of the sugar binding site of yeast hexokinase B. *J Mol Biol* **123**: 207-219.

- Andreone, T.L., Printz, R.L., Pilkis, S.J., Magnuson, M.A. & Granner, D.K. (1989).** The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA. *J Biol Chem* **264**: 363-9.
- Bali, D., Svetlanov, A., Lee, H.W., Fuscodemane, D., Leiser, M., Li, B.J., Barzilai, N., Surana, M., Hou, H., Fleischer, N., Depinho, R., Rossetti, L. & Efrat, S. (1995).** Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J Biol Chem* **270**: 21464-21467.
- Bazan, J.F., Fletterick, R.J. & Pilkis, S.J. (1989).** Evolution of a bifunctional enzyme: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose- 2,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9642-6.
- Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gomez, F.A., Alam, T., Gerard, R.D. & Newgard, C.B. (1994).** Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol* **43**: 161-89.
- Becker, T.C., Noel, R.J., Johnson, J.H., Lynch, R.M., Hirose, H., Tokuyama, Y., Bell, G.I. & Newgard, C.B. (1996).** Differential effects of overexpressed glucokinase and hexokinase I in isolated islets. Evidence for functional segregation of the high and low Km enzymes. *J Biol Chem* **271**: 390-4.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. & Seino, S. (1990).** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **13**: 198-208.
- Berry, M.N., Phillips, J.W. & Grivell, A.R. (1992).** Interactions between mitochondria and cytoplasm in isolated hepatocytes. *Curr Top Cell Regul* **33**: 309-28.
- Bertrand, L., Deprez, J., Vertommen, D., Di Pietro, A., Hue, L. & Rider, M.H. (1997a).** Site-directed mutagenesis of Lys-174, Asp-179 and Asp-191 in the 2- kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem J* **321**: 623-7.
- Bertrand, L., Vertommen, D., Depiereux, E., Hue, L., Rider, M.H. & Feytmans, E. (1997b).** Modelling the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase on adenylate kinase. *Biochem J* **321**: 615-21.

- Bosco, D., Meda, P. & Iynedjian, P.B. (2000).** Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem J* **348**: 215-222.
- Böttger, A., Bottger, V., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Hochkeppel, H.K., Sampson, W., Ang, K., Howard, S.F., Picksley, S.M. & Lane, D.P. (1997).** Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J Mol Biol* **269**: 744-56.
- Böttger, V., Bottger, A., Howard, S.F., Picksley, S.M., Chene, P., Garcia-Echeverria, C., Hochkeppel, H.K. & Lane, D.P. (1996).** Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene* **13**: 2141-7.
- Brent, R. & Ptashne, M. (1985a).** A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* **314**: 198.
- Brent, R. & Ptashne, M. (1985b).** A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**: 729-36.
- Brown, K.S., Kalinowski, S.S., Megill, J.R., Durham, S.K. & Mookhtiar, K.A. (1997).** Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* **46**: 179-86.
- Cheadle, C., Ivashchenko, Y., South, V., Searfoss, G.H., French, S., Howk, R., Ricca, G.A. & Jaye, M. (1994).** Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library. *J Biol Chem* **269**: 24034-9.
- Chen, C., Hosokawa, H., Bumbalo, L.M. & Leahy, J.L. (1994).** Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest* **94**: 1616-20.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991).** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9578-82.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991).** Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-8.
- Clark, D.G., Filsell, O.H. & Topping, D.L. (1979).** Effects of fructose concentration on carbohydrate metabolism, heat production and substrate cycling in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* **184**: 501-7.

- Daniels, D.A. & Lane, D.P. (1994).** The characterisation of p53 binding phage isolated from phage peptide display libraries. *J Mol Biol* **243**: 639-52.
- de la Iglesia, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J.J. & Agius, L. (2000).** The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem* **275**: 10597-603.
- de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J.J. & Ferrer, J.C. (1999).** Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett* **456**: 332-8.
- Detheux, M. & Van Schaftingen, E. (1994).** Heterologous expression of an active rat regulatory protein of glucokinase. *FEBS Lett* **355**: 27-9.
- Detheux, M., Vandekerckhove, J. & Van Schaftingen, E. (1993).** Cloning and sequencing of rat liver cDNAs encoding the regulatory protein of glucokinase. *FEBS Lett* **321**: 111-115.
- Detheux, M., Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1991).** Effectors of the regulatory protein acting on liver glucokinase: a kinetic investigation. *Eur J Biochem* **200**: 553-61.
- Devlin, J.J., Panganiban, L.C. & Devlin, P.E. (1990).** Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**: 404-6.
- Efrat, S., Tal, M. & Lodish, H.F. (1994).** The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends Biochem Sci* **19**: 535-8.
- Estojak, J., Brent, R. & Golemis, E.A. (1995).** Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol* **15**: 5820-9.
- Farrelly, D., Brown, K.S., Tieman, A., Ren, J., Lira, S.A., Hagan, D., Gregg, R., Mookhtiar, K.A. & Hariharan, N. (1999).** Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14511-6.
- Fernandez-Novell, J.M., Castel, S., Bellido, D., Ferrer, J.C., Vilaro, S. & Guinovart, J.J. (1999).** Intracellular distribution of hepatic glucokinase and glucokinase regulatory protein during the fasted to refeed transition in rats. *FEBS Lett* **459**: 211-4.

- Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-6.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994).** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**: 286-92.
- Froguel, P. & Velho, G. (1994).** Maturity-onset diabetes of the young. *Curr Opin Pediatr* **6**: 482-5.
- Froguel, P., Velho, G., Passa, P. & Cohen, D. (1993a).** Genetic determinants of type 2 diabetes mellitus: lessons learned from family studies. *Diabete Metab* **19**: 1-10.
- Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P. & et, a.l. (1993b).** Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* **328**: 697-702.
- Gardsvoll, H., van Zonneveld, A.J., Holm, A., Eldering, E., van Meijer, M., Dano, K. & Pannekoek, H. (1998).** Selection of peptides that bind to plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) using random peptide phage-display libraries. *FEBS Lett* **431**: 170-4.
- Garrard, L.J. & Henner, D.J. (1993).** Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops. *Gene* **128**: 103-9.
- Gidh-Jain, M., Takeda, J., Xu, L.Z., Lange, A.J., Vionnet, N., Stoffel, M., Froguel, P., Velho, G., Sun, F., Cohen, D., Patel, P., Lo, Y.-M.D., Hattersley, A.T., Luthman, H., Wedell, A., Charles, R.S., Harrison, R.W., Weber, I.T., Bell, G.I. & Pilkis, S.J. (1993).** Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1932-6.
- Goodson, R.J., Doyle, M.V., Kaufman, S.E. & Rosenberg, S. (1994).** High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7129-33.
- Grimsby, J., Coffey, J.W., Dvoroziak, M.T., Magram, J., Li, G., Matschinsky, F.M., Shiota, C., Kaur, S., Magnuson, M.A. & Grippo, J.F. (2000).** Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *J Biol Chem* **275**: 7826-31.

- Grupe, A., Hultgren, B., Ryan, A., Ma, Y.H., Bauer, M. & Stewart, T.A. (1995).** Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* **83**: 69-78.
- Guarente, L. (1993).** Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1639-41.
- Hattersley, A.T. & Turner, R.C. (1993).** Mutations of the glucokinase gene and type 2 diabetes. *Q J Med* **86**: 227-32.
- Hattersley, A.T., Turner, R.C., Permutt, M.A., Patel, P., Tanizawa, Y., Chiu, K.C., O'Rahilly, S., Watkins, P.J. & Wainscoat, J.S. (1992).** Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* **339**: 1307-10.
- Heimberg, H., De Vos, A., Vandercammen, A., Van Schaftingen, E., Pipeleers, D. & Schuit, F. (1993).** Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. *Embo J* **12**: 2873-9.
- Hong, S.S. & Boulanger, P. (1995).** Protein ligands of the human adenovirus type 2 outer capsid identified by biopanning of a phage-displayed peptide library on separate domains of wild-type and mutant penton capsomers. *Embo J* **14**: 4714-27.
- Hoogenboom, H.R. & Winter, G. (1992).** By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* **227**: 381-8.
- Hughes, S.D., Quaade, C., Johnson, J.H., Ferber, S. & Newgard, C.B. (1993).** Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem* **268**: 15205-12.
- Iynedjian, P.B. (1993).** Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* **293**: 1-13.
- Iynedjian, P.B., Gjinovci, A. & Renold, A.E. (1988).** Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem* **263**: 740-4.
- Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Nousepikel, T., Asfari, M. & Pilot, P.R. (1989).** Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem* **264**: 21824-9.

- Iynedjian, P.B., Mobius, G., Seitz, H.J., Wollheim, C.B. & Renold, A.E. (1986).** Tissue-specific expression of glucokinase: identification of the gene product in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 1998-2001.
- Iynedjian, P.B., Ucla, C. & Mach, B. (1987).** Molecular cloning of glucokinase cDNA. Developmental and dietary regulation of glucokinase mRNA in rat liver. *J Biol Chem* **262**: 6032-8.
- Jetton, T.L., Liang, Y., Pettepher, C.C., Zimmerman, E.C., Cox, F.G., Horvath, K., Matschinsky, F.M. & Magnuson, M.A. (1994).** Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* **269**: 3641-54.
- Jörns, A., Tiedge, M. & Lenzen, S. (1999).** Nutrient-dependent distribution of insulin and glucokinase immunoreactivities in rat pancreatic beta cells. *Virchows Arch* **434**: 75-82.
- Kay, B.K., Adey, N.B., He, Y.S., Manfredi, J.P., Mataragnon, A.H. & Fowlkes, D.M. (1993).** An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene* **128**: 59-65.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S. & Bell, G.I. (1990).** Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* **265**: 13276-82.
- Kishchenko, G., Batliwala, H. & Makowski, L. (1994).** Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J Mol Biol* **241**: 208-13.
- Koranyi, L.I., Tanizawa, Y., Welling, C.M., Rabin, D.U. & Permutt, M.A. (1992).** Human islet glucokinase gene. Isolation and sequence analysis of full-length cDNA. *Diabetes* **41**: 807-11.
- Kurland, I.J., el-Maghrabi, M.R., Correia, J.J. & Pilkis, S.J. (1992).** Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Properties of phospho- and dephospho- forms and of two mutants in which Ser32 has been changed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **267**: 4416-23.

- Kurland, I.J., Li, L., Lange, A.J., Correia, J.J., el-Maghrabi, M.R. & Pilkis, S.J. (1993).** Regulation of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Role of the NH₂-terminal region. *J Biol Chem* **268**: 14056-64.
- Lauvrak, V., Brekke, O.H., Ihle, O. & Lindqvist, B.H. (1997).** Identification and characterisation of C1q-binding phage displayed peptides. *Biol Chem* **378**: 1509-19.
- Lee, Y.H., Ogata, C., Pflugrath, J.W., Levitt, D.G., Sarma, R., Banaszak, L.J. & Pilkis, S.J. (1996).** Crystal structure of the rat liver fructose-2,6-bisphosphatase based on selenomethionine multiwavelength anomalous dispersion phases. *Biochemistry* **35**: 6010-9.
- Lee, Y.H., Okar, D., Lin, K. & Pilkis, S.J. (1994).** Mechanism of modulation of rat liver fructose-2,6-bisphosphatase by nucleoside triphosphates. *J Biol Chem* **269**: 11002-10.
- Lenzen, S. (1990).** Hexose recognition mechanisms in pancreatic B-cells. *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 105-107.
- Lenzen, S. (1992).** Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In Flatt, P.R. (ed.) *Nutrient regulation of insulin secretion*. Portland Press, London and Chapel Hill, pp. 101-125.
- Lenzen, S., Brand, F.H. & Panten, U. (1988a).** Structural requirements of alloxan and ninhydrin for glucokinase inhibition and of glucose for protection against inhibition. *Br J Pharmacol* **95**: 851-9.
- Lenzen, S., Freytag, S. & Panten, U. (1988b).** Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol* **34**: 395-400.
- Lenzen, S., Freytag, S., Panten, U., Flatt, P.R. & Bailey, C.J. (1990).** Alloxan and ninhydrin inhibition of hexokinase from pancreatic islets and tumoural insulin-secreting cells. *Pharmacol Toxicol* **66**: 157-62.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988).** Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* **37**: 371-378.
- Lenzen, S. & Tiedge, M. (1994).** Regulation of pancreatic B-cell glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression. *Biochem Soc Trans* **22**: 1-6.

- Lenzen, S., Tiedge, M. & Panten, U. (1987).** Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol Copenh* **115**: 21-9.
- Liang, Y., Jetton, T.L., Zimmerman, E.C., Najafi, H., Berner, D.K., Matschinsky, F.M. & Magnuson, M.A. (1994).** Effects of glucose on insulin secretion, glucokinase activity, and transgene expression in transgenic mouse islets containing an upstream glucokinase promoter-human growth hormone fusion gene. *Diabetes* **43**: 1138-45.
- Liang, Y., Najafi, H., Smith, R.M., Zimmerman, E.C., Magnuson, M.A., Tal, M. & Matschinsky, F.M. (1992).** Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage, and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture. *Diabetes* **41**: 792-806.
- Lin, S.X., Vogel, W.K. & Neet, K.E. (1989).** Stoichiometry of slow binding of palmitoyl-CoA to liver glucokinase. *Int J Pept Protein Res* **34**: 333-9.
- Ma, J. & Ptashne, M. (1988).** Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**: 443-6.
- Magnuson, M.A. (1990).** Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* **39**: 523-7.
- Magnuson, M.A., Andreone, T.L., Printz, R.L., Koch, S. & Granner, D.K. (1989).** Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4838-42.
- Magnuson, M.A. & Shelton, K.D. (1989).** An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* **264**: 15936-42.
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Davies, D.R., Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1990).** Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets. *Eur J Biochem* **190**: 539-45.
- Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M.A., Tanizawa, Y., Jetton, T.L. & et al. (1993a).** Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* **92**: 2092-8.

Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M.A., Tanizawa, Y., Jetton, T.L., Niswender, K. & Magnuson, M.A. (1993b). Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* **92**: 2092-8.

Matschinsky, F.M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* **39**: 647-52.

Matsuda, T., Noguchi, T., Yamada, K., Takenaka, M. & Tanaka, T. (1990). Regulation of the gene expression of glucokinase and L-type pyruvate kinase in primary cultures of rat hepatocytes by hormones and carbohydrates. *J Biochem Tokyo* **108**: 778-84.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-4.

Meglasson, M.D. & Matschinsky, F.M. (1984). New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol* **246**: E1-E13.

Meglasson, M.D. & Matschinsky, F.M. (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* **2**: 163-214.

Middleton, R.J. (1990). Hexokinases and glucokinases. *Biochem Soc Trans* **18**: 180-3.

Miwa, I., Mitsuyama, S., Toyoda, Y., Nonogaki, T., Aoki, S. & Okuda, J. (1990). Evidence for the presence of rat liver glucokinase in the nucleus as well as in the cytoplasm. *Biochem Int* **22**: 759-67.

Mongiovi, A.M., Romano, P.R., Panni, S., Mendoza, M., Wong, W.T., Musacchio, A., Cesareni, G. & Di Fiore, P.P. (1999). A novel peptide-SH3 interaction. *Embo J* **18**: 5300-9.

Mookhtiar, K.A., Kalinowski, S.S., Brown, K.S., Tsay, Y.H., Smith-Monroy, C. & Robinson, G.W. (1996). Heterologous expression and characterization of rat liver glucokinase regulatory protein. *Diabetes* **45**: 1670-7.

Moukil, M., Veiga-da-Cunha, M. & Van Schaftingen, E. (2000). Study of the Regulatory Properties of Glucokinase by Site-Directed Mutagenesis. *Diabetes* **49**: 195-201.

Mukhtar, M., Stubbs, M. & Agius, L. (1999). Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS Lett* **462**: 453-8.

- Müller, S., Boles, E. & Zimmermann, F.K. (1996).** A two-hybrid system analysis shows interactions between 6-phosphofructo- 1-kinase and 6-phosphofructo-2-kinase but not between other glycolytic enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **236**: 626-31.
- Murata, T., Katagiri, H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Asano, T., Toyoda, Y., Pekiner, B., Pekiner, C., Miwa, I. & Oka, Y. (1997).** Co-localization of glucokinase with actin filaments. *FEBS Lett* **406**: 109-13.
- Niculescu, L., Veiga-da-Cunha, M. & Van Schaftingen, E. (1997).** Investigation on the mechanism by which fructose, hexitols and other compounds regulate the translocation of glucokinase in rat hepatocytes. *Biochem J* **321**: 239-46.
- Nishi, S., Stoffel, M., Xiang, K., Shows, T.B., Bell, G.I. & Takeda, J. (1992).** Human pancreatic beta-cell glucokinase: cDNA sequence and localization of the polymorphic gene to chromosome 7, band p 13. *Diabetologia* **35**: 743-7.
- Noma, Y., Bonner Weir, S., Latimer, J.B., Davalli, A.M. & Weir, G.C. (1996).** Translocation of glucokinase in pancreatic beta-cells during acute and chronic hyperglycemia. *Endocrinology* **137**: 1485-91.
- Nouspikel, T., Gjinovci, A., Li, S. & Iynedjian, P.B. (1992).** Unimpaired effect of insulin on glucokinase gene expression in hepatocytes challenged with amylin. *Febs Lett* **301**: 115-8.
- Nouspikel, T. & Iynedjian, P.B. (1992).** Insulin signalling and regulation of glucokinase gene expression in cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* **210**: 365-73.
- Oka, Y. (1994).** NIDDM--genetic marker; glucose transporter, glucokinase, and mitochondria gene. *Diabetes Res Clin Pract* **24**: 117-21.
- Ovadi, J. & Srere, P.A. (1996).** Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell Biochem Funct* **14**: 249-58.
- Ovadi, J. & Srere, P.A. (2000).** Macromolecular compartmentation and channeling. *Int Rev Cytol* **192**: 255-80.
- Panten, U., Schwanstecher, M. & Schwanstecher, C. (1992).** Pancreatic and extrapancreatic sulfonylurea receptors. *Horm Metab Res* **24**: 549-54.

- Panten, U., Schwanstecher, M. & Schwanstecher, C. (1996).** Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**: 1-9.
- Panten, U., Schwanstecher, M., Wallasch, A. & Lenzen, S. (1988).** Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **338**: 459-62.
- Parhami-Seren, B., Keel, T. & Reed, G.L. (1997).** Sequences of antigenic epitopes of streptokinase identified via random peptide libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **271**: 333-41.
- Parmley, S.F. & Smith, G.P. (1988).** Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**: 305-18.
- Patel, P., Lo, Y.M., Hattersley, A., Bell, G.I., Tybjaerg, H.A., Nerup, J., Turner, R.C. & Wainscoat, J.S. (1992).** Linkage analysis of maturity-onset diabetes of the young with microsatellite polymorphisms. No linkage to ADA or GLUT2 genes in two families. *Diabetes* **41**: 962-7.
- Permutt, M.A. (1991).** Use of DNA polymorphisms for genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **5**: 495-526.
- Permutt, M.A., Chiu, K.C. & Tanizawa, Y. (1992).** Glucokinase and NIDDM. A candidate gene that paid off. *Diabetes* **41**: 1367-72.
- Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J. & Lange, A.J. (1995).** 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem* **64**: 799-835.
- Pilkis, S.J., Weber, I.T., Harrison, R.W. & Bell, G.I. (1994).** Glucokinase: structural analysis of a protein involved in susceptibility to diabetes. *J Biol Chem* **269**: 21925-8.
- Ploug, M., Ostergaard, S., Hansen, L.B., Holm, A. & Dano, K. (1998).** Photoaffinity labeling of the human receptor for urokinase-type plasminogen activator using a decapeptide antagonist. Evidence for a composite ligand-binding site and a short interdomain separation. *Biochemistry* **37**: 3612-22.

- Printz, R.L., Koch, S., Potter, L.R., O'Doherty, R.M., Tiesinga, J.J., Moritz, S. & Granner, D.K. (1993a).** Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J Biol Chem* **268**: 5209-19.
- Printz, R.L., Magnuson, M.A. & Granner, D.K. (1993b).** Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr* **13**: 463-96.
- Raab-Graham, K.F., Cirilo, L.J., Boettcher, A.A., Radeke, C.M. & Vandenberg, C.A. (1999).** Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* **274**: 29122-9.
- Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S. & Zoller, M.J. (1994).** Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *Embo J* **13**: 5598-604.
- Rider, M.H., Crepin, K.M., De Cloedt, M., Bertrand, L., Vertommen, D. & Hue, L. (1995).** Study of the roles of Arg-104 and Arg-225 in the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by site-directed mutagenesis. *Biochem J* **309**: 341-6.
- Sakura, H., Eto, K., Kadowaki, H., Simokawa, K., Ueno, H., Koda, N., Fukushima, Y., Akanuma, Y., Yazaki, Y. & Kadowaki, T. (1992).** Structure of the human glucokinase gene and identification of a missense mutation in a Japanese patient with early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **75**: 1571-3.
- Sakurai, T., Johnson, J.H. & Uyeda, K. (1996).** Islet fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase: isozymic form, expression, and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 159-63.
- Scott, J.K. & Smith, G.P. (1990).** Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**: 386-90.
- Sener, A., Van Schaftingen, E., Van de Winkel, M., Pipeleers, D.G., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. & Hers, H.G. (1984).** Effects of glucose and glucagon on the fructose 2,6-bisphosphate content of pancreatic islets and purified pancreatic B-cells. A comparison with isolated hepatocytes. *Biochem J* **221**: 759-64.

- Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J.F. & Magnuson, M.A. (1999).** Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* **274**: 37125-30.
- Simon, D.I., Wei, Y., Zhang, L., Rao, N.K., Xu, H., Chen, Z., Liu, Q., Rosenberg, S. & Chapman, H.A. (2000).** Identification of a urokinase receptor-integrin interaction site. Promiscuous regulator of integrin function. *J Biol Chem* **275**: 10228-34.
- Smith, G.P. (1985).** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-7.
- Sparks, A.B., Quilliam, L.A., Thorn, J.M., Der, C.J. & Kay, B.K. (1994).** Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage- displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* **269**: 23853-6.
- Spivey, H.O. & Merz, J.M. (1989).** Metabolic compartmentation. *Bioessays* **10**: 127-30.
- Srere, P.A. & Ovadi, J. (1990).** Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett* **268**: 360-4.
- St. Charles, R., Harrison, R.W., Bell, G.I., Pilkis, S.J. & Weber, I.T. (1994).** Molecular model of human beta-cell glucokinase built by analogy to the crystal structure of yeast hexokinase B. *Diabetes* **43**: 784-91.
- Stephen, C.W., Helminen, P. & Lane, D.P. (1995).** Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* **248**: 58-78.
- Takeda, J., Gidh, J.M., Xu, L.Z., Froguel, P., Velho, G., Vaxillaire, M., Cohen, D., Shimada, F., Makino, H., Nishi, S. & et, a.l. (1993).** Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. *J Biol Chem* **268**: 15200-4.
- Tal, M., Wu, Y.J., Leiser, M., Surana, M., Lodish, H., Fleischer, N., Weir, G. & Efrat, S. (1992).** [Val12] HRAS downregulates GLUT2 in beta cells of transgenic mice without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5744-8.

- Tanizawa, Y., Koranyi, L.I., Welling, C.M. & Permutt, M.A. (1991).** Human liver glucokinase gene: cloning and sequence determination of two alternatively spliced cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7294-7.
- Tanizawa, Y., Matsutani, A., Chiu, K.C. & Permutt, M.A. (1992).** Human glucokinase gene: isolation, structural characterization, and identification of a microsatellite repeat polymorphism. *Mol Endocrinol* **6**: 1070-81.
- Tauler, A., Lange, A.J., el-Maghrabi, M.R. & Pilkis, S.J. (1989).** Expression of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- biphosphatase and its kinase domain in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7316-20.
- Tauler, A., Rosenberg, A.H., Colosia, A., Studier, F.W. & Pilkis, S.J. (1988).** Expression of the biphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo-2- kinase/fructose-2,6-biphosphatase in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6642-6.
- Thorens, B. (1992).** Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* **137**: 209-38.
- Tiedge, M., Krug, U. & Lenzen, S. (1997).** Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. *Biochem Biophys Acta* **1337**: 175-190.
- Tiedge, M. & Lenzen, S. (1991).** Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells. *Biochem J* **279**: 899-901.
- Tiedge, M. & Lenzen, S. (1995).** Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT2 gene expression in pancreatic B- cells and liver from rats. *Biochem J* **308**: 139-144.
- Tiedge, M., Steffek, H., Elsner, M. & Lenzen, S. (1999).** Metabolic regulation, activity state, and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes* **48**: 514-23.
- Tippett, P.S. & Neet, K.E. (1982a).** An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J Biol Chem* **257**: 12846-52.
- Tippett, P.S. & Neet, K.E. (1982b).** Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *J Biol Chem* **257**: 12839-45.

- Toyoda, Y., Miwa, I., Kamiya, M., Ogiso, S., Nonogaki, T., Aoki, S. & Okuda, J. (1994).** Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 252-6.
- Toyoda, Y., Miwa, I., Kamiya, M., Ogiso, S., Nonogaki, T., Aoki, S. & Okuda, J. (1995a).** Tissue and subcellular distribution of glucokinase in rat liver and their changes during fasting-refeeding. *Histochem Cell Biol* **103**: 31-8.
- Toyoda, Y., Miwa, I., Satake, S., Anai, M. & Oka, Y. (1995b).** Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* **215**: 467-73.
- Unger, R.H. (1991).** Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* **251**: 1200-5.
- Van Schaftingen, E. (1989).** A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem* **179**: 179-84.
- Van Schaftingen, E. (1995).** Glucosamine-sensitive and -insensitive detritiation of [2-³H]glucose in isolated rat hepatocytes: a study of the contributions of glucokinase and glucose-6-phosphatase. *Biochem J* **308**: 23-29.
- Van Schaftingen, E., Davies, D.R. & Hers, H.G. (1982).** Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur J Biochem* **124**: 143-9.
- Van Schaftingen, E., Detheux, M. & Veiga da Cunha, M. (1994).** Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J* **8**: 414-419.
- Van Schaftingen, E. & Vandercammen, A. (1989).** Stimulation of glucose phosphorylation by fructose in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **179**: 173-7.
- Van Schaftingen, E., Veiga-da-Cunha, M. & Niculescu, L. (1997).** The regulatory protein of glucokinase. *Biochem Soc Trans* **25**: 136-40.
- Vandercammen, A., Detheux, M. & Van Schaftingen, E. (1992).** Binding of sorbitol 6-phosphate and of fructose 1-phosphate to the regulatory protein of liver glucokinase. *Biochem J* **286**: 253-6.

- Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1990).** The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem* **191**: 483-9.
- Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1991).** Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur J Biochem* **200**: 545-51.
- Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1993).** Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *Biochem J* **294**: 551-556.
- Veiga da Cunha, M., Courtois, S., Michel, A., Gosselain, E. & Van Schaftingen, E. (1996).** Amino acid conservation in animal glucokinase. Identification of residues implicated in the interaction with the regulatory protein. *J Biol Chem* **271**: 6292-6297.
- Veiga da Cunha, M., Detheux, M., Watelet, N. & Van Schaftingen, E. (1994).** Cloning and expression of a *Xenopus* liver cDNA encoding a fructose-phosphate-insensitive regulatory protein of glucokinase. *Eur J Biochem* **225**: 43-51.
- Veiga-da-Cunha, M., Xu, L.Z., Lee, Y.H., Marotta, D., Pilkis, S.J. & Van Schaftingen, E. (1996).** Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein. *Diabetologia* **39**: 1173-9.
- Warner, J.P., Leek, J.P., Intody, S., Markham, A.F. & Bonthron, D.T. (1995).** Human glucokinase regulatory protein (GCKR): cDNA and genomic cloning, complete primary structure, and chromosomal localization. *Mamm Genome* **6**: 532-6.
- Welch, G.R. & Easterby, J.S. (1994).** Metabolic channeling versus free diffusion: transition-time analysis. *Trends Biochem Sci* **19**: 193-7.
- Xu, L.Z., Harrison, R.W., Weber, I.T. & Pilkis, S.J. (1995a).** Human beta-cell glucokinase. Dual role of Ser-151 in catalysis and hexose affinity. *J Biol Chem* **270**: 9939-46.
- Xu, L.Z., Weber, I.T., Harrison, R.W., Gidh, J.M. & Pilkis, S.J. (1995b).** Sugar specificity of human beta-cell glucokinase: correlation of molecular models with kinetic measurements. *Biochemistry* **34**: 6083-92.
- Xu, L.Z., Zhang, W., Weber, I.T., Harrison, R.W. & Pilkis, S.J. (1994).** Site-directed mutagenesis studies on the determinants of sugar specificity and cooperative behavior of human beta-cell glucokinase. *J Biol Chem* **269**: 27458-65.

Yang, M., Wu, Z. & Fields, S. (1995). Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res* **23**: 1152-6.

Lebenslauf

Name: **Baltrusch**
Vorname: **Simone Erika**
Geburtsdatum: **23. Juli 1971**
Geburtsort: **Hannover**
Staatsangehörigkeit: **deutsch**
Familienstand: **ledig**

August 1978 – Juli 1984 Grundschule und Orientierungsstufe Nord
Springe

August 1984 – Juni 1991 Otto-Hahn Gymnasium Springe
Allgemeine Hochschulreife 1991

WS 1991/92 – SS1996 Studium der Pharmazie an der Technischen
Universität Carolo-Wilhelmina
Braunschweig
*Erster Abschnitt der Pharmazeutischen
Prüfung 1994*
*Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen
Prüfung 1996*

Juni – Dezember 1996 Pharmaziepraktikum in der Tiergarten-
Apotheke Hannover

Januar – Mai 1997 Pharmaziepraktikum in der
Krankenhausapotheke der Henriettenstiftung
Hannover
*Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen
Prüfung und Approbation als Apothekerin
1997*

Juli – September 1997 Berufstätigkeit in der Niedertor Apotheke
Springe

ab Oktober 1997 Durchführung der vorliegenden Dissertation
am Institut für Klinische Biochemie der
Medizinischen Hochschule Hannover
(Prof. Dr. S. Lenzen)